

Fisiopatologia do prurido nos linfomas cutâneos de células T Papel das interleucinas 8 e 31

MARIA DE ABREU NUNES DA SILVA

Mestrado Integrado em Medicina do ICBAS/UP

Orientador: **Prof. Doutora Margarida Lima**, HSA/CHP e ICBAS/UP

Coorientador: **Prof. Doutora Alice Santos Silva**, FFUP

Porto, 2016

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Medicina

**FISIOPATOLOGIA DO PRURIDO NOS LINFOMAS CUTÂNEOS
DE CÉLULAS T
PAPEL DAS INTERLEUCINAS 8 E 31**

ESTUDANTE:

Maria de Abreu Nunes da Silva

ORIENTADOR:

Professora Doutora Margarida Lima

Assistente Hospitalar Graduada, Consultora de Imunohemoterapia

Responsável pelo Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Hospital de
Santo António, Centro Hospitalar do Porto

Professora Auxiliar Convidada do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da
Universidade do Porto

COORIENTADOR:

Professora Doutora Alice Santos Silva

Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PORTO

2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os envolvidos sem os quais este projeto não seria possível, começando pela Professora Doutora Margarida Lima, pela orientação dedicada e ajuda incansável ao longo do desenvolvimento de todo o projecto, e pelas Professoras Doutora Alice Santos Silva e Susana Coimbra, pela orientação e ajuda no doseamento das interleucinas.

Também agradeço às Dras. Mafalda Castro, Catarina Lau, Inês Freitas, Iolanda Fernandes, Renata Cabral e às técnicas Ana Helena Santos e Sónia Fonseca, pelo respetivo envolvimento nas diferentes fases do estudo.

Às Dras. Mafalda Castro e Susana Coimbra agradeço ainda a disponibilidade que demonstraram para esclarecer questões.

Igualmente, quero agradecer a todas os médicos, enfermeiras e técnicos do Laboratório de Citometria e dos departamentos de Hematologia, Dermatologia e Dadores de Sangue do CHP, pelo suporte no estudo realizado.

Finalmente, ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP) e à Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica do ICBAS/UP (UMIB/ICBAS/UP), pelo suporte financeiro para a realização deste estudo.

RESUMO

Introdução: O prurido, definido como uma sensação desagradável da pele ou das mucosas que desperta vontade de coçar, pode ser uma reacção fisiológica a um estímulo, ou pode ser patológico. Os mecanismos envolvidos na sua génese são complexos e ainda pouco conhecidos. O mediador melhor estudado e sobre o qual a terapêutica normalmente incide é a histamina, e os seus receptores H1. No entanto, a histamina não desempenha um papel importante em todos os tipos de prurido, e em alguns casos a terapêutica com anti-histamínicos é pouco eficaz. Foram propostos vários mediadores para o prurido não histaminérgico, como a serotonina, a prostaglandina E2, o péptido libertador de gastrina, proteases, como a tripsina e triptase, os leucotrienos, a acetilcolina, o ácido lisofosfatídico e as interleucinas, mas poucos estão comprovados e raros possuem terapêuticas dirigidas. Os doentes com linfomas cutâneos de células T (LCCT) apresentam com frequência prurido crónico, intenso e debilitante, em que o tratamento sintomático é pouco eficaz com os meios disponíveis, incluindo os anti-histamínicos, pelo que é importante identificar os mediadores envolvidos e que, no futuro possam vir a constituir novos alvos terapêuticos.

Objetivos: Avaliar se os níveis séricos de interleucinas (IL) -31 e -8 estão aumentados nos doentes com LCCT e se têm correlação com a intensidade do prurido, tal como é percebido pelos doentes. Estudar a relação entre os níveis séricos destes mediadores e a quantidade de células de linfoma no sangue periférico, assim como o estadio da doença e biomarcadores de atividade da mesma.

Material e Métodos: O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para a Saúde e pelo Departamento de Ensino, Formação e Investigação, e autorizado pelo Conselho de Administração do Centro Hospitalar do Porto (CHP). Foram avaliados os níveis séricos de IL-8 e de IL-31 em amostras de sangue periférico de doentes com LCCT seguidos na Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos do Hospital de Santo António, Centro Hospitalar do Porto, e de indivíduos adultos saudáveis, dadores de sangue do mesmo hospital. A selecção da amostra foi não aleatória, por conveniência, e foi solicitado consentimento informado por escrito. Foram registados a idade e o género e, no caso dos doentes com LCCT, o tipo de linfoma cutâneo e o seu estadio, assim como diversos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e foi pedido aos doentes que classificassem a intensidade do prurido usando uma escala analógica visual, de 0 (sem prurido) a 10 (o prurido mais intenso que consigam imaginar). O doseamento de interleucinas foi realizado no soro pelo método de ELISA e a quantificação das células de linfoma no sangue foi feita por citometria de fluxo. A análise estatística, descritiva e inferencial, foi feita usando o programa SPSS (*Statistical Package for the*

Social Sciences). Para comparar os níveis séricos de interleucinas entre grupos foram usados os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis e para estudar a correlação entre as concentrações séricas de interleucinas e a intensidade do prurido foi usado o coeficiente de correlação de Pearson. Foi considerado significativo um valor de $p < 0.05$.

Resultados: O estudo envolveu 29 doentes com LCCT (52% do género masculino, mediana de idades 66 anos), dos quais 17 com Micose Fungóide (MF), 10 com Síndrome de Sézary (SS) e 2 com outros tipos de linfoma, e um grupo controlo de 29 indivíduos saudáveis (48% do género masculino, mediada de idades 59 anos). Os níveis séricos de IL-31 foram significativamente mais elevados nos doentes com LCCT do que nos controlos, assim como significativamente maiores em doentes com SS do que nos com MF. Também estavam significativamente aumentados nos doentes em estadios mais avançados da doença relativamente aos mais precoces, e correlacionaram-se positivamente com os níveis de desidrogenase de lactato e beta2 microglobulina, assim como com a contagem absoluta de células de Sézary no sangue periférico. Os níveis séricos de IL-31 mostraram ainda ser significativamente maiores nos doentes com prurido, quando comparados com os que não tinham, e nos doentes com prurido intenso/severo relativamente aos com prurido leve/moderado. Já os níveis séricos de IL-8 não diferiram significativamente entre casos e controlos, nem com a gravidade da doença, mas correlacionaram-se positivamente com as contagens de neutrófilos e monócitos. Mostraram ainda uma tendência para um aumento nos doentes com prurido intenso/severo comparativamente aos com prurido leve/moderado, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas. Os níveis séricos de IL-31 e IL-8 não se correlacionaram significativamente entre si quando avaliada a população estudada como um todo (doentes + controlos), mas foi encontrada uma correlação positiva quando considerados apenas o grupo de doentes.

Conclusão: Os resultados do presente estudo sugerem que o prurido, sintoma debilitante no LCCT, está relacionado com os níveis séricos de IL-31, mas que estes também têm relação com o estadio da doença e como marcadores de atividade da mesma, reforçando os resultados obtidos em outros estudos previamente publicados. Assim, consideramos que a IL-31 deve ser ponderada como potencial alvo terapêutico. É possível que a IL-8 possa desempenhar um papel no agravamento do prurido nos doentes infetados, mediante recrutamento de neutrófilos e exacerbação dos fenómenos inflamatórios.

NOTA INTRODUTÓRIA

A dissertação de Mestrado Integrado em Medicina aqui apresentada na modalidade “Artigo de Investigação” resultou de um projeto de investigação desenvolvido no âmbito da unidade curricular “Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica” (DIIC) do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Durante o ano letivo 2014/2015 foi elaborada a proposta de projeto de investigação, que foi aprovada pela Comissão de Ética e pelo Gabinete Coordenador da Investigação do Departamento de Ensino, Formação e Investigação, e autorizada pelo Conselho de Administração do CHP. No ano lectivo 2015/2016, foi concretizado o projeto.

O estudo foi executado na Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos do CHP, tendo a parte experimental sido realizada no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP e no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob orientação e supervisão da Professora Doutora Margarida Lima e coorientação da Professora Alice Santos Silva.

Assim, a dissertação encontra-se estruturada em duas partes, correspondentes a trabalhos resultantes do projeto em causa:

1. Artigo original a submeter para publicação em revista científica de Hematologia;
2. Trabalho a submeter para apresentação na forma de *poster* em reunião de Hematologia.

Como apêndice é apresentada a proposta do projeto de investigação, e, como anexos, os documentos para os participantes e os documentos de submissão do projeto.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO	iii
NOTA INTRODUTÓRIA	v
PARTE 1. ARTIGO CIENTÍFICO PARA PUBLICAÇÃO	1
PHYSIOPATHOLOGY OF ITCH IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA: ROLE OF IL-8 AND IL-31	2
ABSTRACT	4
INTRODUCTION	5
MATERIAL AND METHODS	7
RESULTS	10
DISCUSSION	14
REFERENCES	19
LIST OF ABBREVIATIONS	26
COMPETING INTERESTS	27
TABLES	28
FIGURE LEGENDS	32
FIGURES	33
PARTE 2. TRABALHO PARA APRESENTAR EM REUNIÃO CIENTÍFICA	37
INTERLEUCINA 31 Y PRURITUS ASSOCIADO A LOS LINFOMAS CUTANEOS DE CELULAS T...	38
ABSTRACT	39
APÊNDICES	41
PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO.....	42
PLANO CIENTÍFICO	43
QUESTÕES ÉTICAS	68
PLANO FINANCEIRO	71
GLOSSÁRIO	73
ANEXOS	76
DOCUMENTOS PARA OS PARTICIPANTES	78
Termo de consentimento informado para doentes participantes	78
Folheto informativo para doentes participantes	79
Termo de consentimento informado para dadores de sangue	80
Folheto informativo para dadores de sangue	81

DOCUMENTOS DE SUBMISSÃO	83
Folha de rosto do estudo de investigação	83
Pedidos de autorização institucional	85
Termos de responsabilidade	86
Termos de autorização local	87

PARTE 1. ARTIGO CIENTÍFICO PARA PUBLICAÇÃO

Nesta secção é apresentada uma proposta de artigo para submeter a publicação em revista científica da área da Hematologia, com revisão por pares e indexada.

PHYSIOPATHOLOGY OF ITCH IN CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA: ROLE OF IL-8 AND IL-31

AUTHORS: Maria Abreu¹, Mafalda Castro^{1,2,3,7}, Renata Cabral^{2,3}, Iolanda Fernandes^{2,4},
Magdalena Leander^{3,6,7}, Ana Helena Santos^{3,6,7}, Sónia Fonseca^{3,6,7}, Marta Miranda⁸, Catarina Lau^{3,6,7},
Inês Freitas^{5,7}, Susana Coimbra^{8,9}, Alice Santos Silva⁸*, Margarida Lima^{1,2,3,6,7} *

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.

²Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos e Mastocitoses (CMLC), Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

³Serviço de Hematologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁴Serviço de Dermatologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁵Departamento of Patologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁶Laboratório de Citometria, Serviço de Hematologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁷Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal.

⁸UCIBIO\REQUIMTE, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto (FFUP), Porto, Portugal.

⁹CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (IINFATS), Gandra-Paredes, Portugal.

* These authors contributed equally to this work

Author's academic degrees and e-mail addresses

Maria Abreu, medical student: Maria_dabreu@hotmail.com

Mafalda Castro, MD: mafaldapimentadecastro@gmail.com

Renata Cabral, MD: renatacabral20@hotmail.com

Iolanda Fernandes, MD: gifconde@hotmail.com

Magdalena Leander, Pharm.D., Ph.D.: magdaleander@gmail.com

Ana Helena Santos, graduated in Clinical Analysis, laboratory technician: anahrs@gmail.com

Sónia Fonseca, graduated in Clinical Analysis, laboratory technician: soniacpfonseca@netcabo.pt

Marta Miranda, MsD student: up201108946@ff.up.pt

Catarina Lau, MD: mccatarinalau@gmail.com

Inês Freitas: maria.ines.freitas@hotmail.com

Susana Coimbra, Pharm.D., Ph.D.: ssn.coimbra@gmail.com

Alice Santos Silva, Pharm.D., Ph.D.: assilva@ff.up.pt

Margarida Lima, M.D., Ph.D.: mmc.lima@clix.pt, margaridalima@chporto.min-saude.pt

Corresponding author

Margarida Lima

Laboratório de Citometria

Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP)

Ex-CICAP, Rua D. Manuel II, s/n, 4099-001 Porto, Portugal

e-mail: mmc.lima@clix.pt

Telephone number: + 351 22 20 77 500

ABSTRACT

Background: Severe, hard-to-treat pruritus is a frequent symptom present in Cutaneous T-Cell Lymphoma (CTCL), however, little is consensual about its pathophysiology and its approach. Interleukins have been proposed to play a role in the genesis of said pruritus, namely IL-31, studied mostly in atopic dermatitis but also other pruritic diseases, and IL-8, a chemotatic cytokine.

Objectives: Our aim is to test whether these interleukins play a role in the pathogenesis of said pruritus, and to infer about its potential as a therapeutic target.

Materials and methods: This study included 29 CTCL patients – 17 patients with Mycosis Fungoides (MF), 10 patients with Sézary Syndrome (SS), and 2 patients with other CTCL –, and a control group of 29 healthy individuals (blood donors). The whole study population supplied blood samples for testing serum IL-31 and IL-8 concentrations through ELISA, and CTCL patients underwent thorough examination, evaluated their pruritus through a visual analogue scale and provided a second blood sample for blood cell counts and flow cytometry.

Results: Serum IL-31 was higher in CTCL patients than in controls, and higher in patients with SS than in those with MF. It was also significantly higher in more advanced stages of the disease, and correlated positively with lactate dehydrogenase and beta 2 microglobulin levels, as well as with the Sézary cell count. IL-31 was also significantly higher among patients with pruritus than in those denying it, and in patients complaining of intense-severe pruritus than in those with mild/moderate pruritus. IL-8 did not differ significantly between patients and controls, and did not vary with disease severity. However, it correlated significantly with the neutrophil and monocyte counts. There was also tendency to higher IL-8 levels in patients with intense/severe pruritus when compared to those with mild/moderate pruritus, but differences were not statistically significant. IL-8 and IL-31 serum levels did not correlate to each other in the whole study population, but they have a positive correlation in patients with CTCL.

Conclusion: Our results suggest that pruritus, a very important symptom in CTCL, is related to serum IL-31 levels, particularly in advanced disease, as consistent with other studies, and as such, it may play a role worthy of therapeutic approach. Increased serum IL-8 observed in some patients may be related to concomitant infections, and its role in exacerbating itch by recruiting neutrophils into the tissues and promoting local inflammation needs to be explored.

Keywords: Cutaneous T cell lymphomas; Sézary Syndrome; Mycosis Fungoides; Itch; IL-31; IL-8.

INTRODUCTION

Cutaneous T-cell lymphomas (CTCL), classically represented by Mycosis Fungoides (MF) and Sezary's syndrome (SS), make up 13% of extranodal non-Hodgkin lymphomas (Bradford *et al.*, 2009). In their generality, they are chronic diseases, and prognosis depends on several factors, namely the specific diagnosis and the stage of the disease.

A frequent feature of CTCL is pruritus, or itching, which is particularly severe in patients with SS and often refractory to the symptomatic treatment currently available (Vij & Duvic, 2012). As it is, although it is assumed symptomatic treatment should be given, there is little consensus as to which.

Pathological pruritus is not exclusive to CTCL; it is associated with numerous diseases, which can be dermatological, systemic, neurological, neuropathic and psychiatric, all of which motivate the study of the pathways involved (Twycross *et al.*, 2003).

Histamin, acting on dorsal root ganglia's H1 receptors, is pathophysiologically involved in causing pruritus in several diseases, and anti-histaminics represent the most prescribed treatment for itch (Thurmond *et al.*, 2014; Thurmond *et al.*, 2015). Nevertheless, not all cases respond to this form of therapeutics, as is the case for CTCL-associated pruritus, and this suggests there may be alternative pathways to its genesis: a non-histaminergic pruritus; although there is no evidence of complete independence of these two pathways.

Non-histaminergic pruritus is difficult to treat, and several factors are suspected of taking part in it, which include substance P (Hägermark, Hökfelt & Pernow, 1978), serotonin (Yamaguchi *et al.*, 1999), prostaglandins (Woodward & Nieves, 1996), gastrin-releasing peptide (Zhao *et al.*, 2013), proteases (Kempkes *et al.*, 2014), leukotrienes (Andoh & Kurashi, 2000), acetylcholine (Heyer *et al.*, 1997), lysophosphatidic acid (Kremer *et al.*, 2010), and a few interleukins (IL) (Storan *et al.*, 2015). Of the later, we emphasize IL-31, produced by T-cells, which has been studied as a likely mediator in non-histaminergic pruritus (Zhang *et al.*, 2008).

Previous studies have reported increased serum IL-31 levels in pruritic diseases, such as atopic dermatitis (AD) (Sonkoly *et al.*, 2006; Szegedi *et al.*, 2012), contact dermatitis (Neis *et al.*, 2006) and even CTCL (Singer *et al.*, 2013). Adding, the correlation between IL-31 and pruritus has been studied, not always with the same results (Kim S *et al.*, 2011; Szegedi K *et al.*, 2012; Siniewicz-Luzeńczyk *et al.*, 2013).

IL-8, which is involved in neutrophil chemotaxis and is known to play a role in the acute inflammatory response (Harada *et al.*, 1994), was previously associated to AD (Kimata *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1999), but not to pruritus; moreover, IL-8 it is not pruritogenic upon cutaneous injection (Bagliolini *et al.*, 1992).

Hence, considering the prevalence and severity of pruritus in CTCL and its resistance to treatment, we chose to investigate the role played by IL-31 and IL-8 in these diseases. With this goal in mind, we determined the serum concentrations of IL-31 and IL-8 in CTCL patients, comparing them to those found in healthy controls; we evaluated if there was a relationship between the serum levels of these cytokines and the CTCL subdiagnosis, the disease stage and the severity of pruritus, as well as other biochemical and hematological parameters.

Through these steps we intended to decide the potential involvement of the ILs 8 and 31 in the pathophysiology of CTCL pruritus and question its utility as a potential therapeutic target.

MATERIAL AND METHODS

The study was approved of by the Department of Education, Training and Research and by the Ethics Committee, and authorized by the Board of Administration of Centro Hospitalar do Porto. Participants were informed of the study's objectives, and agreed to take part, signing an informed consent.

Study population

The study population included 29 with CTCL patients frequenting the Multidisciplinary Consultation for Cutaneous Lymphoma, and 29 healthy controls (blood donors, first-time donors excluded, with no pruritic symptomatology and with no history of pruritic disease). Patients with active infection or concomitant non-hematological neoplasms were excluded.

Data

Clinical data obtained included the lymphoma's classification, kind and extension of cutaneous lesion, presence/absence of pruritus and its intensity. Treatment, if present at the time of the study, was also recorded, just as concomitant diseases and relevant past clinical history.

Itch was accessed through a visual analogue scale (VAS), ranging from "0" to 10, "0" meaning complete absence of pruritus and 10 the largest intensity ever felt by the patient. Arbitrarily, pruritus referred between 1 and 5 in said scale was considered mild/moderate and pruritus ranging between 6 and 10 was considered intense/severe.

Criteria for diagnosis of SS included erythroderma, peripheral lymphadenopathy, and peripheral blood Sezary Cells (SC), defined by at least one of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL)'s criteria: (i) absolute SC count $\geq 1000/\text{mm}^3$; (ii) CD4/CD8 ratio ≥ 10 through increase on CD4+ T cell count and/or anomalous cytometric phenotype; (iii) lymphocytosis, with T-cell monoclonal proliferation evidenced by polymerase chain reaction; (vi) evidence of chromosomal anomalies (Vonderheid *et al.*, 2002).

Lymphoma TNMB (tumor-node-metastasis-blood) staging was established using the ISCL/EORTC revision to the Mycosis Fungoides Cooperative Group classification, and staging system for CTCL (Olsen *et al.*, 2007).

The evaluation of erythroderma was made using a scale with 5 levels (0= normal; 1= barely detectable erythema and scaling; 2=readily detectable erythema, edema and scaling; 3= marked

erythema and skin exfoliation; 4=fissuring, maximal erythema, induration and tumorous lesions) and evaluating the percentual cutaneous area afflicted (Bernengo *et al.*, 2007).

Two samples of peripheral blood were taken from patients, one in an anticoagulant-free tube for dosing serum ILs, and one in a tube containing K3-EDTA (tripotassium ethylenediamine tetra-acetic acid) for blood cell counts and flow cytometry studies. Only the first sample was taken for controls.

Serum was obtained from the anticoagulant-free samples, through centrifugation, and criopreserved at -20°C until utilization. The dosing of ILs was made through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), using the following kits: *LEGEND MAX™ Human IL-8 ELISA Kit with Pre-coated Plates* e *LEGEND MAX™ Human IL-31 ELISA Kit with Pre-coated Plates* (Biolegend, San Diego, CA, USA) and expressed in picograms per ml (pg/ml).

Blood cell counts were obtained through automatic hematological counter (LH780, Coulter). Differential leukocyte count was confirmed and the search for SC morphology was made through optic microscopy in peripheral blood smear with Leishman's staining. Absolute and relative cell counts for neutrophiles, lymphocytes and monocytes, and platelets were registered ($\times 10^9/L$ and % respectively), just as hemoglobin levels (g/dL). Biochemical analysis included glucose, liver (bilirubin, aspartate transaminase, and alanine transaminase, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transpeptidase) and kidney (creatinine and urea) function tests, $\beta 2$ microglobulin (B2MG) and lactate dehydrogenase (LDH).

Sézary cell count and characterization was made through flow cytometry using a direct immunofluorescence technique and making in 4 to 8 colors stainings with fluorochrome conjugated monoclonal antibodies specific for the following antigens: CD2, CD3, TCR, CD4, CD5, CD7, CD8, CD26 e CD28, and completed with the study of the repertoire of the TCR beta chain variable region repertoire, determined by a panel of commercially available TCR-Vbeta specific antibodies (Immunotech, Beckman Coulter), as previously described (Lima *et al.*, 2004). Samples were read in a BD FACSCanto ITM flow cytometer (Becton Dickinson) and analyzed though the InfinicytTM program (Cytognos).

TCR gene rearrangement studies were performed as previously described in detail (Moura *et al.*, 2016), following the Biomed-2 protocol (van Dongen *et al.*, 2013).

Statistic analysis

In the descriptive statistic analysis, results were presented through relative and absolute frequencies for qualitative variables, and medians, minimums and maximums for continuous quantitative variables. Comparative statistic analysis was made using the non-parametric tests of Mann-Whitney U test for comparison between 2 continuous quantitative variables. Chi-square test was used to compare frequencies in categorical variables, and correlation between continuous quantitative variables were accessed through Spearman's rank test.

IL-31 and IL-8 levels were compared between cases and controls, within the patient's group, between patient with no pruritus (VAS 0) and patients with pruritus (VAS 1 to 10), and between patients with mild/moderate pruritus (VAS 1 to 5) and patients with intense/severe pruritus (VAS 6 to 10). Said levels were also correlated with the absolute count of SC in the peripheral blood, just as with the absolute count of leucocytes, neutrophils, monocytes and lymphocytes. Correlation between serum IL-31 and IL-8 levels were also accessed. P values inferior to 0.05 were considered statistically significant.

The data analysis was made with the informatics program Statistical Package for the Social Sciences (SPSS®), v23.

RESULTS

Study population

Twenty-nine CTCL patients and 29 controls were included in the study. The patients median age was of 66 years, varying from 36 to 90 years, and the median of controls' ages was of 59 years, varying between 50 and 67 years. Fifteen patients (51.7%) and 14 controls (48.3%) were males.

The sociodemographic and clinical characteristics of the CTCL patients can be seen in Table 1. Among cases, 17 patients were diagnosed with MF (58.6%), 15 of which fit in the classical variant and 2 of which were classified as folliculotropic, 10 patients were diagnosed with SS (34.5%), 1 with CD30+ anaplastic large cell lymphoma (3.4%), and 1 with peripheral CTCL, not otherwise specified. In all cases, the lymphoma originated from CD4+ T cells. Twenty-three patients were studied during follow-up (79.3%), and 6 at the time of diagnosis (20.7%).

All patients had active disease at the time of the study and cutaneous lesions of some sort. The more often found cutaneous lesions were patches (19 cases; 65.5%), plaques (9 cases; 31.0%), and erythroderma (also found in 9 cases, all of them being SS patients). Only one SS patient bore no erythroderma at the time of the evaluation. Erythroderma was scored as "2" in 1 patient, as "3" in 4 patients, and as "4" in another 4 patients. The total diseased surface area was inferior to 10% in 9 patients (31.0%), and equal or superior to 80% in 11 patients (37.9%), 9 of which being SS patients. At the time of the study, 2 patients (6.9%) had palpable lymph nodes.

Accordingly to the TMNB staging schema, 9 patients were classified as stage Ia, 11 patients as stage Ib, 4 patients as stage IIIb and 5 patients as stage IVa, totaling 20 patients (69.0%) with early (I+II) and 9 patients (31.0%) with advanced (III+IV) disease.

Eighteen patients (62.1%) complained of pruritus at the time of the study, including all of the SS patients and 8 of the MF patients. The median severity score as reported through VAS was "1", and ranged from null (VAS score = 0), to the most severe itching ever experienced (VAS score 10). Pruritus was classified as mild/moderate (VAS score from 1 to 5) in 7 patients (24.1%), and as intense/severe (VAS score from 6 to 10) in 11 patients (37.9%). The VAS scores tended to be extreme, with 6 of the patients (20.7%) mentioning a VAS score from 1 to 3, only 1 patient reporting VAS score of 5, and 11 (37.9%) reporting a VAS score over 8.

Among patients with early disease, the VAS score was significantly lower than among those with advanced disease (median value of "0", varying between "0" and 10 and median value of 10

varying between 5 and 10 respectively) ($p<0.001$). There were also significant differences in VAS scores between MF (median value of “0”, varying between “0” and 10) and SS (median value of 9 varying between 1 and 10 respectively) ($p<0.001$).

Nineteen patients (65.5%) were under some sort of therapeutic regime directed at the disease at the time of the study, 11 (37.9%) of which were applying topical corticosteroids, 4 (13.8%) were medicated with low doses oral methotrexate, 3 (10.3%) with oral bexarotene, 2 (6.9%) with oral corticosteroids, and 1 patient was doing extracorporeal photopheresis. As for purely symptomatic therapy, 11 patients (37.9%) were receiving anti-histaminics, 1 patient was medicated with mirtazepin and 1 patient was medicated with aprepitant.

Thirteen patients (44.8%) had concomitant pathology, of which we find worthiest of mentioning 2 patients (6.9%) with psoriasis and 2 with alcoholic liver disease. In addition, 3 patients (10.3%) had history of previous neoplasm (1 gastric diffuse large B cell lymphoma, 1 carcinoma of the thyroid gland and 1 gastric adenocarcinoma), all of which treated in the past and considered in complete remission at the time of the study.

All patients had a complete blood count, lymphocyte immunophenotyping and a summary biochemical analysis for the day of consultation (Table 2).

Concerning the blood cell counts, the median leucocyte count was of $7.0 \times 10^9/L$, with 3 patients (5.2%) revealing leucocytosis (defined as over 11×10^9 leucocytes/L) and one patient presenting mild leucopenia ($<4.0 \times 10^9/L$). Neutrophil counts had a median of $4.23 \times 10^9/L$. Neutrophilia ($>7.0 \times 10^9/L$) was observed in one patient, but no patients had neutropenia ($<1.5 \times 10^9/L$). Ten patients had lymphopenia ($<1.5 \times 10^9/L$) and 4 had lymphocytosis ($>3.5 \times 10^9/L$), the lymphocyte count showing a median of $2.32 \times 10^9/L$. Anemia ($Hg<12.0g/dl$) was found in 7 patients (24.1%). Only one patient had $Hg <10.0g/dl$, and this patient was the only one presenting thrombocytopenia ($<100 \times 10^9/L$).

Flow cytometry and TCR rearrangement studies revealed the presence of circulating SC in 11 patients (37.9%) (10 SS and 1 MF), and they represented more than 5% of the lymphocyte count in 10 cases (34.4%). The absolute SC count was superior to 1000 cells/ μl in 5 patients (17.2%). The malignant T cells were typically CD3+, TCR-alpha/beta+, CD4+, and CD5+, they failed to express CD26, and they frequently had abnormally low levels of CD3 and/or CD4, as well as low or absent CD7 expression (data not shown). The TCR-Vbeta studies allowed for the identification of the expanded TCR-Vbeta family in 8 cases; in the remaining 3 cases, the expanded TCR-Vbeta family

was not identified with the panel of monoclonal antibodies used; nonetheless, a dilution pattern consistent with the presence of a monoclonal CD4+ T cell population was observed (data not shown).

Twelve out of 24 patients with CTCL (50.0%) had increased serum LDH levels (23.1% of MF cases and 80.0% of SS cases), and 8 out of 25 patients (32.0%) had increased B2MG levels (20.0% of MF and 55.6% of SS cases). Serum LDH and B2MG was significantly higher in patients with SS, as compared to patients with MF ($p = 0.002$ and $p = 0.027$, respectively).

Serum IL-31 and IL-8

Serum IL-31 levels in CTCL patients (median value of 23.1 pg/ml) were significantly higher than those of controls (median value of 7.8 pg/ml) ($p=0.021$) (Table 3 and Figure 1, panel A). Also, SS patients had significantly higher serum IL-31 levels (median of 28.3 pg/ml) when compared to controls ($p<0.001$), as well as when compared to MF patients (median of 11.4 pg/ml) ($p=0.005$), whereas no significant differences were observed between MF patients and controls ($p>0.05$) (Table 3 and Figure 1, panel A).

Serum IL-8 levels, on the other hand, did not differ significantly between patients and controls (median values of 10.2 and 9.3 pg/ml respectively), nor among the diagnostic groups ($p>0.05$ in both cases) (Table 3 and Figure 1 panel B). The SS patient presenting the highest IL-8 serum levels came to perish later due to sepsis with urinary tract focus.

In respect to disease stage, no significant differences in serum IL-31 levels were observed upon comparing early (I + II) and advanced (III + IV) disease stages (median values of 10.9 and 28.3 pg/ml, respectively; $p = 0.005$); and only patients with advanced disease had significantly higher serum IL-31 levels as compared to controls ($p<0.001$).

Concerning the biochemical parameters, serum IL-31 correlated significantly with serum LDH and B2MG ($p < 0.001$, $R = 0.689$ and $p = 0.002$, $R = 0.609$ respectively), even after excluding two outliers corresponding to patients with very high serum IL-31 (Figure 2, panels A and B). We also found serum IL-8 to be positively correlated with serum LDH and B2MG, although reaching marginal statistical significance only for the latter ($p = 0.094$, $R = 0.349$ and $p = 0.048$, $R = 0.400$, respectively).

Regarding hematological counts, we found a positive correlation between serum IL-31 and the presence of phenotypically abnormal CD4⁺ T cells ($p < 0.001$, $R = 0.642$), and it remained statistically significant after excluding 2 high IL-31 outliers (Figure 2, panels C).

On the other hand, IL-8 correlated strongly with neutrophil and weakly but significantly with monocyte counts ($p = 0.009$ and $p = 0.049$, respectively) (Figure 3, panels A and B). This significance for monocytes was lost after eliminating the outlier with the highest IL-8 concentration.

Considering pruritus, we notice serum IL-31 levels were significantly higher in patients complaining of pruritus (median of 27.7 pg/ml), compared to those who felt none (median of 10.3 pg/ml) ($p = 0.01$), as well as compared with controls ($p = 0.002$) (Table 3 and Figure 1, panel B), just as there was a statistically significant increase in the IL-31 levels in the group of patients reporting intense/severe pruritus (VAS score from 6 to 10) (median of 28.3 pg/ml) when compared to those reporting mild/moderate pruritus (VAS score from 1 to 5) (median of 7.8 pg/ml) ($p = 0.039$) (Figure 1, panel C). IL-31 was also significantly higher in patients reporting a VAS score 6-10 when compared to controls ($p < 0.001$), but not significantly different between patients reporting a VAS score 1-5 and controls ($p = 0.726$) (Table 3). When considering only patients with MF, the relationship between IL-31 with pruritus was also noted, with patients with mild/moderate pruritus having significantly lower serum IL-31 levels than those with intense/severe pruritus (median values of 6.80 pg/ml and 47.5 pg/ml, respectively; $p = 0.025$).

On the other hand, IL-8 showed no statistically significant variation among any of these groups ($p > 0.05$ in all situations). Despite this, there was a tendency to higher IL-8 levels in patients classifying pruritus as intense/severe when compared to those with mild/moderate pruritus (median values of 20.8 and 8.2 pg/ml, respectively; $p = 0.057$).

Considering the total of the study population, IL-31 and IL-8 serum levels showed no correlation to each other (Figure 2, panel A) ($p > 0.05$). However, considering exclusively CTCL patients, there was a statistically significant positive correlation between IL-31 and IL-8 ($p = 0.037$; $R = 0.396$); this remained statistically significant after excluding 2 high IL-31 and 1 high IL-18 outliers (Figure 2, panel C). This was also observed when analyzing only MF patients ($p = 0.026$; $R = 0.539$) or only CTCL patients without circulating lymphoma cells ($p = 0.030$; $R = 0.511$), but not when analyzing only SS patients, nor all CTCL patients with circulating lymphoma cells ($p > 0.05$ in both cases).

DISCUSSION

It is somewhat consensual that IL-31 has a role in the genesis of pruritus, and it was studied both in animal models (Arai *et al.*, 2013, Arai *et al.*, 2015) and in human patients. In the later, IL-31 has been associated to a large variety of systemic pruriginous diseases, such as atopic dermatitis, where correlation with pruritus was shown (Kim *et al.*, 2011; Szegedi *et al.*, 2012; Ezzat *et al.*, 2011; Raap *et al.*, 2012), but also in contact dermatitis (Neis *et al.*, 2006), chronic urticaria (Raap *et al.*, 2010), lichen planus (Welz-Kubiak *et al.*, 2015), uremic syndrome (Ko *et al.*, 2014) and even iatrogenic, drug-induced pruritus (Gangemi *et al.*, 2013). IL-8 is known to have an important role in neutrophil chemotaxis during inflammatory responses (Harada *et al.*, 1994), and despite having been previously associated to AD (Kimata *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1999), this cytokine has not been associated with pruritus.

Serum interleukin levels and disease activity

Serum IL-31

This study supports a relationship between IL-31 and CTCL, being coherent with other studies made in this area (Singer *et al.*, 2013; Ohmatsu *et al.*, 2012; Malek *et al.*, 2015). Some other studies, though, have reported conflicting results. For instance, Mobs *et al.* (2015), found no statistically significant differences in serum IL-31 levels between SS and MF.

In respect to disease severity, we found serum IL-31 to be higher in advanced disease stages and to be significantly correlated with serum LDH and B2MG levels, which are known to be markers of disease activity and prognosis (Diamandidou *et al.*, 1999). Similar results were obtained by Ohmatsu *et al.* (2012), who observed a statistically significant positive association between serum IL-31 levels and disease activity of CTCL, evaluated by the type of lesions, disease stage and soluble biomarkers.

Previous studies have shown that the immune response is strongly T helper (Th) 2 biased in advanced CTCL whereas in early disease a Th1 profile predominates (Saed *et al.*, 1994; Papadavid *et al.*, 2003), and that leukemic CTCL cells produce mainly Th2 cytokines, such as IL-4 (Guenova *et al.*, 2013). Taking in consideration that IL-31 is produced mainly by Th2 cells (Castellani *et al.*, 2010), and that IL-31 production is dependent on IL-4 (Stott *et al.*, 2013), the apparently discrepant results found in the literature may be explained by differences in patients' characteristics. In fact, 96.6% of the patients studied by Singer *et al.* (2013) had advanced disease (stages III + IV) while only 14.5% of the patients in Malek *et al.*'s series did. Sézary Syndrome was also more common in

Singer's series than in Malek's, where it accounted for 70.0% and 2.5% of the patients, respectively. In our series the representation of advanced disease and SS cases was intermediate (31% for both).

The production of IL-31 is not completely understood as of yet. Evidence for the synthesis of IL-31 by the neoplastic CTCL cells was provided in three recent studies: Singer *et al.* (2013) found intracellular IL-31 expression in CD4⁺ T cells of pruritic patients, post stimulation with phytohemagglutinin and ionomycin; Mobs *et al.* (2015) observed that IL-31 mRNA was not detectable in blood tumor cells of SS patients although SC, as normal T cells, were able to secrete IL-31 upon stimulation with phytohemagglutinin and ionomycin; and Cedeno-Laurent *et al.*, also in 2015, demonstrated that chemokine receptor type-4-bearing T cells are a main source of IL-31 in CTCL. Thus, it seems that both normal and neoplastic T cells are able to produce IL-31, although at different levels, and that they both need to be stimulated in order to produce this cytokine. This stimulation might be caused by bacterial toxins, such as those produced by *Staphylococcus aureus*, which frequently colonize the skin of CTCL and AD patients. In fact, staphylococcal superantigens were shown to induce IL-31 expression in the skin from atopic individuals, and staphylococcal enterotoxin B induces IL-31 production by leukocytes (Sonkoly *et al.*, 2006).

Serum IL-8

Unlike to what was found in patients with AD (Kimata *et al.*, 1994; Hatano *et al.*, 1999), serum IL-8 levels were not significantly higher in patients with CTCL than in healthy controls, nor did it vary with disease activity.

Serum interleukin levels and blood cell counts

Serum IL-31

Considering the blood cell counts, we noticed a significant positive association between serum IL-31 levels and phenotypically abnormal CD4⁺ T cell counts, coherent with the hypothesis that states it might be produced by T malignant cells (Singer *et al.* 2013; Cedeno-Laurent *et al.* 2015). This correlation was, however, lost when considering only patients with SS were considered, perhaps because the neoplastic T cells might differ in their ability to produce IL-31.

Serum IL-8

The positive correlation between serum IL-8 levels and neutrophil counts was expected, because of its role in neutrophil chemotaxis (Harada *et al.*, 1994), and its association with monocytes is explainable by the fact that IL-8 may be partly secreted by these cells (Shaio *et al.*, 1995). The fact that the patient presenting the highest levels of serum IL-8 had hyperleukocytosis, marked erythroderma and recalcitrant itch, and came to perish shortly thereafter due to sepsis with urinary tract focus, in spite of not having clinical evidence of infection at the time he was included in this study, is coherent with the possibility of IL-8 involvement in inflammatory / infectious responses.

Serum interleukin levels and pruritus

The results obtained from the VAS were somewhat extremed; such was expected facing how debilitating CTCL is, and considering the subjectivity inherent to a VAS evaluation, but we noted another study, upon using VAS, had a uniform intensity distribution along the scale (Malek *et al.*, 2015).

Serum IL-31

There were statistically significant differences in IL-31 levels between groups with and without pruritus, just as between mild/moderate pruritus and intense /severe pruritus. These results are coherent with those obtained by Singer *et al.* (2013), but not with those obtained by Malek *et al.* (2015), neither with those obtained by Mobs *et al.* (2015). In fact, despite finding serum IL-31 significantly higher in 62 CTCL patients than in 96 controls, Malek *et al.* did not observe statistically significant differences in serum IL-31 levels between 42 itching and 20 non-itching CTCL patients, neither a positive correlation between the serum IL-31 with the itch score. As it is, and since SS patients had significantly higher VAS scores and IL-31 levels, we cannot exclude that the SS diagnosis might work as a confusing factor. Against this possibility, we note we also found this relation in MF cases. Also, Mobs *et al.* (2015) did not find statistically significant differences in serum IL-31 between itching and non-itching CTCL, nor between CTCL stages or between MF and SS; however, as mentioned by the authors, this was probably because of the atypically low concentrations of IL-31 (undetectable in most patients) they obtained.

Serum IL-8

Once again, there was no statistically significant relation between IL-8 and pruritus, but its relationship to pruritus seems to lean towards significance and is still stronger than its relation to the existence of disease. IL-8 is likely responsible for neutrophil chemotaxis (Harada *et al.*, 1994), and CTCL-associated inflammatory response might justify *per se* this apparent tendency towards correlation. However, we cannot exclude the possibility that IL-8 might play a part in increasing pruritus during infectious episodes, and bacterial toxins produced by bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, which frequently colonize the skin from AD and CTCL patients (Tokura *et al.*, 1995; Talpur *et al.*, 2008) may be involved in this process. In accordance, using *in vitro* experiments, Suwa *et al.* (2013) showed that IL-8 mRNA expression might be enhanced in keratinocytes by histamine via H4 receptors, and Hatano *et al.* (1999) found that the levels of IL-8 mRNA were elevated in peripheral blood mononuclear cells from patients with AD, decreasing upon therapeutic-induced symptomatic remission. In addition, previous studies in AD have shown that IL-31 supplementation causes a significant increase in epidermal *Staphylococcus aureus* colonization, as well as an up-regulation of *Staphylococcus aureus*-induced IL-8 expression (van Drongelen *et al.*, 2014).

Correlation between serum IL-31 and serum IL-8 levels

IL-31 was not significantly correlatable to IL-8 in the population as a whole. Its association in CTCL, which is weaker than the relation between IL-31 and pruritus, might be simply due to an inflammatory response associated to active disease, but we cannot exclude a closer relation. Previous studies in AD have suggested that IL-31 could induce IL-8 expression (Wong *et al.*, 2012), perhaps through facilitated epidermal colonization by *Staphylococcus aureus* (van Drongelen *et al.*, 2014), or through keratinocyte stimulation (Dai *et al.*, 2013).

Hence, an association between serum IL-31 and subjective perception of pruritus was demonstrated, which is why we would like to propose it as a mediator of pruritic genesis in CTCL, and as a cause for non-histaminergic pruritus, even though very little about its role and action pathways is clear. Our findings would also suggest a possible link between IL-31 and IL-8, between cells from the adaptive (i.e. T lymphocytes) and innate (i.e. neutrophils and monocytes) immune system, as well as between neoplastic (lymphoma) and infectious (bacteria) conditions, and itch induction in patients with CTCL. A possible indirect role for IL-8 in exacerbating itching in CTCL, especially in patients with concomitant infections, as frequently occurring in SS, needs to be

explored, with emphasis on the proteases produced by bacteria, such as staphylococci and streptococci, and neutrophil proteases, which might be able to induce itch by acting on proteinase activated receptors (Kempkes *et al.*, 2014).

Finally, it would make sense to develop new approaches to CTCL-associated pruritus, having IL-31 and its receptor as targets, analogously to what is being done for AD (Nemoto *et al.* 2015).

.

REFERENCES

- Andoh T, Kuraishi Y. Involvement of blockade of leukotriene B(4) action in anti-pruritic effects of emedastine in mice. *Eur J Pharmacol.* 2000;406:149-52. DOI: 10.1016/S0014-2999(00)00637-3. PMID: 11011046
- Arai I, Tsuji M, Miyagawa K, Takeda H, Akiyama N, Saito S. Repeated administration of IL-31 upregulates IL-31 receptor A (IL-31RA) in dorsal root ganglia and causes severe itch-associated scratching behaviour in mice. *Exp Dermatol.* 2015;24:75-8. DOI: 10.1111/exd.12587. PMID: 25381841
- Arai I, Tsuji M, Takeda H, Akiyama N, Saito S. A single dose of interleukin-31 (IL-31) causes continuous itch-associated scratching behaviour in mice. *Exp Dermatol.* 2013;22:669-71. DOI: 10.1111/exd.12222. PMID: 24079740
- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992;307:97-101. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80909-Z. PMID: 1639201
- Bernengo MG, Quaglino P, Comessatti A, Ortoncelli M, Novelli M, Lisa F, Fierro MT. Low-dose intermittent alemtuzumab in the treatment of Sézary syndrome: clinical and immunologic findings in 14 patients. *Haematologica.* 2007;92:784-94. DOI:10.3324/haematol.11127. PMID: 17550851
- Bradford PT, Devesa SS, Anderson WF, Toro JR. Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases. *Blood.* 2009;113:5064-73. doi: 10.1182/blood-2008-10-184168. PMID: 19279331
- Castellani ML, Felaco P, Galzio RJ, Tripodi D, Toniato E, De Lutiis MA, Fulcheri M, Caraffa A, Antinolfi P, Tetè S, Felaco M, Conti F, Pandolfi F, Theoharides TC, Shaik-Dasthagirisheeb YB. IL-31 a Th2 cytokine involved in immunity and inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010;23:709-13. PMID: 20943040
- Cedeno-Laurent F, Singer EM, Wysocka M, Benoit BM, Vittorio CC, Kim EJ, Yosipovitch G, Rook AH. Improved pruritus correlates with lower levels of IL-31 in CTCL patients under different therapeutic modalities. *Clin Immunol.* 2015;158:1-7. doi: 10.1016/j.clim.2015.02.014. PMID: 25762519
- Dai X, Okazaki H, Hanakawa Y, Murakami M, Tohyama M, Shirakata Y, Sayama K. Eccrine sweat contains IL-1 α , IL-1 β and IL-31 and activates epidermal keratinocytes as a danger signal. *PLoS One.* 2013;8:e67666. doi: 10.1371/journal.pone.0067666. PMID: 23874436

- Diamandidou E, Colome M, Fayad L, Duvic M, Kurzrock R. Prognostic factor analysis in mycosis fungoides/Sézary syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1999;40:914-24. DOI: 10.1016/S0190-9622(99)70079-4. PMID: 10365922
- Ezzat MH, Hasan ZE, Shaheen KY. Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011;25:334-9. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03794.x. PMID: 21294778
- Gangemi S, Franchina T, Minciullo PL, Profita M, Zanghì M, David A, Kennez I, Adamo V. IL-33/IL-31 axis: a new pathological mechanisms for EGFR tyrosine kinase inhibitors-associated skin toxicity. *J Cell Biochem.* 2013;114:2673-6. doi: 10.1002/jcb.24614. PMID: 23794184
- Guenova E, Watanabe R, Teague JE, Desimone JA, Jiang Y, Dowlathshahi M, Schlapbach C, Schaekel K, Rook AH, Tawa M, Fisher DC, Kupper TS, Clark RA. TH2 cytokines from malignant cells suppress TH1 responses and enforce a global TH2 bias in leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19:3755-63. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3488. PMID: 23785046
- Hägermark O, Hökfelt T, Pernow B. Flare and itch induced by substance P in human skin. *J Invest Dermatol.* 1978;71:233-5. PMID: 81243
- Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994;56:559-64. PMID: 7964163
- Hatano Y, Katagiri K, Takayasu S. Increased levels in vivo of mRNAs for IL-8 and macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha), but not of RANTES mRNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with atopic dermatitis (AD). *Clin Exp Immunol.* 1999;117:237-43. doi: 10.1046/j.1365-2249.1999.00982.x PMID: 10444253
- Heyer G, Vogelgsang M, Hornstein OP. Acetylcholine is an inducer of itching in patients with atopic eczema. *J Dermatol.* 1997;24:621-5. DOI: 10.1111/j.1346-8138.1997.tb02305.x. PMID: 9375459
- Kempkes C, Buddenkotte J, Cevikbas F, Buhl T, Steinhoff M. Role of PAR-2 in neuroimmune communication and itch. In: Carstens E, Akiyama T, editors. *Itch: Mechanisms and Treatment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014. Chapter 11. PMID: 24829999
- Kim S, Kim HJ, Yang HS, Kim E, Huh IS, Yang JM. IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2011;23:468-73. doi: 10.5021/ad.2011.23.4.468. PMID: 22148014

- Kimata H, Lindley I. Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis. *Arch Dis Child*. 1994;70:119-22. PMID: 8129432
- Ko MJ, Peng YS, Chen HY, Hsu SP, Pai MF, Yang JY, Wen SY, Jee SH, Wu HY, Chiu HC. Interleukin-31 is associated with uremic pruritus in patients receiving hemodialysis. *J Am Acad Dermatol*. 2014;71:1151-1159.e1. doi: 10.1016/j.jaad.2014.08.004. PMID: 25270263
- Kremer AE, Martens JJ, Kulik W, Ruëff F, Kuiper EM, van Buuren HR, van Erpecum KJ, Kondrackiene J, Prieto J, Rust C, Geenes VL, Williamson C, Moolenaar WH, Beuers U, Oude Elferink RP. Lysophosphatidic acid is a potential mediator of cholestatic pruritus. *Gastroenterology*. 2010;139:1008-18, 1018.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.009. PMID: 20546739
- Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Santos AH, Fonseca S, Balanzategui A, Justica B, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping and DNA ploidy studies for diagnosis and characterization of blood involvement in CD4+ Sézary's syndrome. *Haematologica*. 2003;88:874-87. PMID: 12935975
- Malek M, Gleń J, Rębała K, Kowalczyk A, Sobjanek M, Nowicki R, Ruckemann-Dziurdzińska K, Sokołowska-Wojdyło M. IL-31 does not correlate to pruritus related to early stage cutaneous T-cell lymphomas but is involved in pathogenesis of the disease. *Acta Derm Venereol*. 2015;95:283-8. doi: 10.2340/00015555-1958. PMID: 25176053
- Möbs M, Gryzik S, Haidar A, Humme D, Beyer M, Vandersee S. Analysis of the IL-31 pathway in Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Arch Dermatol Res*. 2015;307:479-85. doi: 10.1007/s00403-014-1527-x. PMID: 25488078
- Moura J, Rodrigues J, Gonçalves M, Amaral C, Lima M, Carvalho E. Impaired T-cell differentiation in diabetic foot ulceration. *Cell Mol Immunol*. 2016 Mar 21. doi: 10.1038/cmi.2015.116. PMID: 26996067
- Neis MM, Peters B, Dreuw A, Wenzel J, Bieber T, Mauch C, Krieg T, Stanzel S, Heinrich PC, Merk HF, Bosio A, Baron JM, Hermanns HM. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:930-7. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.07.015. PMID: 17030248
- Nemoto O, Furue M, Nakagawa H, Shiramoto M, Hanada R, Matsuki S, Imayama S, Kato M, Hasebe I, Taira K, Yamamoto M, Mihara R, Kabashima K, Ruzicka T, Hanifin J, Kumagai Y. The first trial of CIM331, a humanized anti-human IL-31 receptor A antibody, for healthy volunteers and

patients with atopic dermatitis to evaluate safety, tolerability and pharmacokinetics of a single dose in a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Dermatol.* 2015 Sep 26. doi: 10.1111/bjd.14207. PMID: 26409172

Ohmatsu H, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Miyagaki T, Kai H, Kagami S, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-31 levels are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol.* 2012;92:282-3. doi: 10.2340/00015555-1345. PMID: 22456907

Olsen E, Vonderheid E, Pimpinelli N, Willemze R, Kim Y, Knobler R, Zackheim H, Duvic M, Estrach T, Lamberg S, Wood G, Dummer R, Ranki A, Burg G, Heald P, Pittelkow M, Bernengo MG, Sterry W, Laroche L, Trautinger F, Whittaker S; ISCL/EORTC. Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Blood.* 2007;110:1713-22. Erratum in *Blood.* 2008;111:4830. PMID: 17540844

Papadavid E, Economidou J, Psarra A, Kapsimali V, Mantzana V, Antoniou C, Limas K, Stratigos A, Stavrianeas N, Avgerinou G, Katsambas A. The relevance of peripheral blood T-helper 1 and 2 cytokine pattern in the evaluation of patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol.* 2003;148:709-18. PMID: 12752128

Raap U, Weißmantel S, Gehring M, Eisenberg AM, Kapp A, Fölster-Holst R. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012;23:285-8. doi: 10.1111/j.1399-3038.2011.01241.x. PMID: 22509760

Raap U, Wieczorek D, Gehring M, Pauls I, Ständer S, Kapp A, Wedi B. Increased levels of serum IL-31 in chronic spontaneous urticaria. *Exp Dermatol.* 2010;19:464-6. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01067.x. PMID: 20163453

Saed G, Fivenson DP, Naidu Y, Nickoloff BJ. Mycosis fungoides exhibits a Th1-type cell-mediated cytokine profile whereas Sezary syndrome expresses a Th2-type profile. *J Invest Dermatol.* 1994;103:29-33. PMID: 8027577

Shao MF, Lin PR, Liu JY, Yang KD. Generation of interleukin-8 from human monocytes in response to *Trichomonas vaginalis* stimulation. *Infect Immun.* 1995;63:3864-70. PMID: 7558293

Singer EM, Shin DB, Nattkemper LA, Benoit BM, Klein RS, Didigu CA, Loren AW, Dentchev T, Wysocka M, Yosipovitch G, Rook AH. IL-31 is produced by the malignant T-cell population in

- cutaneous T-Cell lymphoma and correlates with CTCL pruritus. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2783-5. doi: 10.1038/jid.2013.227. PMID: 23698099
- Siniewicz-Luzeńczyk K, Stańczyk-Przyłuska A, Zeman K. Correlation between serum interleukin-31 level and the severity of disease in children with atopic dermatitis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30:282-5. doi: 10.5114/pdia.2013.38356. PMID: 24353487
- Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, Alenius H, Dieu-Nosjean MC, Meller S, Rieker J, Steinhoff M, Hoffmann TK, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:411-7. doi: 10.1016/j.jaci.2005.10.033. PMID: 16461142
- Storan ER, O'Gorman SM, McDonald ID, Steinhoff M. Role of cytokines and chemokines in itch. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;226:163-76. doi: 10.1007/978-3-662-44605-8_9. PMID: 25861779
- Stott B, Lavender P, Lehmann S, Pennino D, Durham S, Schmidt-Weber CB. Human IL-31 is induced by IL-4 and promotes TH2-driven inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:446-54.e5. doi: 10.1016/j.jaci.2013.03.050. PMID: 23694808
- Suwa E, Yamaura K, Sato S, Ueno K. Increased expression of the histamine H4 receptor following differentiation and mediation of the H4 receptor on interleukin-8 mRNA expression in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2014;23:138-40. doi: 10.1111/exd.12313. PMID: 24372819
- Szegedi K, Kremer AE, Kezic S, Teunissen MB, Bos JD, Luiten RM, Res PC, Middelkamp-Hup MA. Increased frequencies of IL-31-producing T cells are found in chronic atopic dermatitis skin. *Exp Dermatol.* 2012;21:431-6. doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01487.x. PMID: 22621183
- Talpur R, Bassett R, Duvic M. Prevalence and treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in patients with mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Br J Dermatol.* 2008;159:105-12. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08612.x. PMID: 18489588
- Thurmond RL, Kazerouni K, Chaplan SR, Greenspan AJ. Peripheral Neuronal Mechanism of Itch: Histamine and Itch. In: Carstens E, Akiyama T, editors. *Itch: Mechanisms and Treatment*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014. Chapter 10. PMID: 24830005
- Thurmond RL, Kazerouni K, Chaplan SR, Greenspan AJ. Antihistamines and itch. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;226:257-90. doi: 10.1007/978-3-662-44605-8_15. PMID: 25861785

- Tokura Y, Yagi H, Ohshima A, Kurokawa S, Wakita H, Yokote R, Shirahama S, Furukawa F, Takigawa M. Cutaneous colonization with staphylococci influences the disease activity of Sézary syndrome: a potential role for bacterial superantigens. *Br J Dermatol*. 1995;133:6-12. PMID: 7669641
- Twycross R, Greaves MW, Handwerker H, Jones EA, Libretto SE, Szepletowski JC, Zylicz Z. Itch: scratching more than the surface. *QJM*. 2003;96:7-26. PMID: 12509645
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, Delabesse E, Davi F, Schuurin E, García-Sanz R, van Krieken JH, Droese J, González D, Bastard C, White HE, Spaargaren M, González M, Parreira A, Smith JL, Morgan GJ, Kneba M, Macintyre EA. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17:2257-317. DOI: 10.1038/sj.leu.2403202. PMID: 14671650
- van Drongelen V, Haisma EM, Out-Luiting JJ, Nibbering PH, El Ghalbzouri A. Reduced filaggrin expression is accompanied by increased *Staphylococcus aureus* colonization of epidermal skin models. *Clin Exp Allergy*. 2014;44:1515-24. doi: 10.1111/cea.12443. PMID: 25352374
- Vij A, Duvic M. Prevalence and severity of pruritus in cutaneous T cell lymphoma. *Int J Dermatol*. 2012;51:930-4. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2011.05188.x. PMID: 22788808
- Vonderheid EC, Bernengo MG, Burg G, Duvic M, Heald P, Laroche L, Olsen E, Pittelkow M, Russell-Jones R, Takigawa M, Willemze R; ISCL. Update on erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma: report of the International Society for Cutaneous Lymphomas. *J Am Acad Dermatol*. 2002;46:95-106. PMID: 11756953
- Welz-Kubiak K, Kobuszevska A, Reich A. IL-31 is overexpressed in lichen planus but its level does not correlate with pruritus severity. *J Immunol Res*. 2015;2015:854747. doi: 10.1155/2015/854747. PMID: 25756056
- Wong CK, Leung KM, Qiu HN, Chow JY, Choi AO, Lam CW. Activation of eosinophils interacting with dermal fibroblasts by pruritogenic cytokine IL-31 and alarmin IL-33: implications in atopic dermatitis. *PLoS One*. 2012;7:e29815. doi: 10.1371/journal.pone.0029815. PMID: 22272250

Woodward, D.F., Nieves, A.L., Friedlaender, M.H., 1996. Characterization of receptor subtypes involved in prostanoid-induced conjunctival pruritus and their role in mediating allergic conjunctival itching. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 137–142. PMID: 8858986

Yamaguchi T, Nagasawa T, Satoh M, Kuraishi Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. *Neurosci Res.* 1999;35:77-83. DOI: 10.1016/S0168-0102(99)00070-X. PMID: 10616911.

Zhao ZQ, Huo FQ, Jeffry J, Hampton L, Demehri S, Kim S, Liu XY, Barry DM, Wan L, Liu ZC, Li H, Turkoz A, Ma K, Cornelius LA, Kopan R, Battey JF Jr, Zhong J, Chen ZF. Chronic itch development in sensory neurons requires BRAF signaling pathways. *J Clin Invest.* 2013;123:4769-80. doi:10.1172/JCI70528. PMID: 24216512

Zhang Q, Putheti P, Zhou Q, Liu Q, Gao W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008;19:347-56. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.08.003. PMID: 18926762

LIST OF ABBREVIATIONS

AD, Atopic dermatitis

B2MG, beta 2 microglobulin

CTCL, cutaneous T cell lymphomas

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

Hg, hemoglobin

IL, interleukin

IL-8, interleukin 8

IL-31, interleukin 31

ISCL, International Society for Cutaneous Lymphomas

K3-EDTA, tripotassium ethylene-diamine tetra-acetic acid

LDH, lactate dehydrogenase

MF, Mycosis Fungoides

SC, Sézary cells

SPSS, Statistical Package for the Social Sciences

SS, Sézary syndrome

TNMB, tumor-node-metastasis-blood

Th1, T helper 1

Th2, T helper 2

VAS, visual analogue scale

COMPETING INTERESTS

The authors declare having no conflicts of interest.

TABLES

Table 1: Socio-demographic and clinical characteristics of the CTCL study population

Age (years)	66 (36 – 90)
Gender (Males / Females)	15 / 14 (51.7% / 48.3%)
CTCL classification	
Mycosis Fungoides	17 (58.6%)
Sézary Syndrome	10 (34.5%)
Other CTCL	2 (6.9%)
Time of evaluation	
At the diagnosis	6 (20.7%)
During the course of the disease	23 (79.3%)
Skin lesions, at the time of the study	
Patches	19 (65.5%)
Plaques	9 (31.0%)
Papules	3 (10.3%)
Nodules	1 (3.4%)
Tumors	2 (6.9%)
Erythroderma	9 (31.0%)
Body surface area affected, at the time of the study	
<10%	9 (31.0%)
[10-80%[9 (31.0%)
≥80%	11 (37.9%)
Disease stage, at the time of the study	
Stages I and II	20 (69.0%)
Stages III and IV	9 (31.0%)
Pruritus, at the time of the study	
Yes (score 1 to 10)	18 (62.1%)
Mild/moderate (score 1 to 5)	7 (24.1%)
Intense/severe (score 6 to 10)	11 (37.9%)
Treatment, at the time of the study	
Directed to the disease	19/29 (65.5%)
Directed to itch	20/29 (69.0%)

Results are presented as mean (range), and as absolute and relative frequencies.
 Abbreviations: CTCL, cutaneous T cell lymphoma.

Table 2: Laboratorial features of the CTCL study population, at the time of the study

Blood cell counts and cytomorphology	
Leucocytes (x10 ⁹ /L)	7.00 (4.50 – 130.70)
Neutrophils (x10 ⁹ /L)	4.23 (1.84 – 15.82)
Lymphocytes (x10 ⁹ /L)	2.32 (0.20 – 96.20)
Monocytes (x10 ⁹ /L)	0.55 (0.08 – 17.25)
Hemoglobin (g/dl)	13.7 (8.6 – 16.5)
Platelets (x10 ⁹ /L)	220 (42 – 357)
Atypical lymphocytes (SC) (% Leucocytes)	0.0 (0.0 – 66.5)
Lymphocyte immunophenotyping	
CD4+ T cell count/μl	922 (23 – 94281)
CD4/CD8 ratio	2.5 (0.6 – 99.0)
Phenotypically abnormal CD4+ T cells (SC)	
% CD4+ T cells	0.0 (0.0 – 99.0)
% Leucocytes	0.0 (0.0 – 71.4)
Cell count /μl	0 (0 – 93332)
Blood involvement	
Yes	11 (37.9%)
Stage B0 (SC <5% lymphocytes)	19 (65.5%)
Stage B1 (SC >5% lymphocytes, <1000 CS/μl)	5 (17.2%)
Stage B2 (SC >1000 CS/ μl)	5 (17.2%)
Biochemistry, at the time of the study	
B2MG (mg/L)	2.08 (1.20 – 14.70)
Increased B2MG (>2.53 mg/L)	8/25 (32.0%)
LDH (U/L)	224 (128 – 656)
Increased LDH (> 225 U/L)	12/24 (50.0%)
Abnormal liver tests	2/29 (6.9%)
Kidney tests (creatinine; ureia)	1/29 (3.4%)

Results are presented as mean (range), and as absolute and relative frequencies.

Abbreviations: CTCL, cutaneous T cell lymphoma; CS, Sézary cells; B2MG, beta2 microglobulin; LDH, Lactate dehydrogenase; MF, Mycosis Fungoides; SS, Sézary Syndrome.

Table 3: IL-31 e IL-8 serum levels in patients with CTCL as compared to healthy controls.

	IL-31	P (Patients vs. Controls)	IL-8	P (Patients vs. Controls)
Controls (n=29)	7.8 (0.3 – 55.3)	-	9.3 (3.4 – 52.0)	-
CTCL (n=29)	23.1 (0.6 – 253.6)	0.021	10.2 (3.4 – 322.5)	0.870
MF (n=17)	11.4 (0.6 – 58.6)	0.333	11.1 (3.4 – 31.2)	1.000
SS (n=10)	28.3 (17.3 – 253.6)	<0.001	13.0 (4.2 – 322.5)	0.736
Non-leukemic (n=18)	9.6 (0.6 – 58.6)	0.584	8.8 (3.4 – 31.2)	0.477
Leukemic (n=11)	32.0 (17.3 – 253.6)	<0.001	15.8 (4.2 – 322.5)	0.505
SC ≤ 5% lymphocytes (n=19)	10.3 (0.6 – 253.6)	0.405	9.3 (3.4 – 31.2)	0.500
SC > 5% lymphocytes (n=10)	28.3 (17.3 – 209.1)	<0.001	18.3 (4.2 – 322.5)	0.810
SC < 1000/μl (n=24)	12.9 (0.6 – 253.6)	0.105	8.8 (3.2 – 32.2)	0.372
SC ≥ 1000/μl (n=5)	28.3 (17.3 – 70.6)	0.011	30.1 (6.0 – 322.5)	0.168
Stages I + II (n=20)	10.3 (0.6 – 253.6)	0.405	9.3 (3.4 – 31.2)	0.500
Stages III + IV (n=9)	28.3 (17.3 – 209.1)	<0.001	18.3 (4.2 – 322.5)	0.810
Without itch (VAS 0) (n=11)	10.3 (0.6 – 30.1)	0.844	7.6 (3.9 – 31.2)	0.422
With itch (VAS 1-10) (n=18)	27.7 (1.4 – 253.6)	0.002	11.4 (3.4 – 322.5)	0.726
Mild/moderate itch (VAS 1-5) (n=7)	7.8 (1.4 – 253.6)	0.726	8.2 (3.4 – 26.1)	0.246
Intense/Severe itch (VAS 6-10) (n=11)	28.3 (17.3 – 209.1)	<0.001	20.8 (4.2 – 322.5)	0.173

Results are presented as mean ± standard deviation, and as median and (range) values. Values were rounded to one decimal place.

Abbreviations: C, controls; CTCL, cutaneous T cell lymphomas; IL-8, interleukin 8; IL-31, interleukin 31, MF, Mycosis Fungoides; SC, Sézary cells; SS, Sézary Syndrome

IL-31: MF vs. SS: p=0.005; Patients without itch (score 0) vs. patients with itch (score 1-10): p=0.010; Patients with mild/moderate itch (score 1-5) vs. patients with intense/severe itch: p=0.039. Sézary cells ≤5% lymphocytes vs. SC >5% lymphocytes: p=0.005. Sézary cells <1000/ml vs. SC ≥ 1000/μl: p=0.093. Stages I+II vs. Stages III+IV: p=0.005.

IL-8: MF vs. SS: p=0.616; Patients without itch (score 0) vs. patients with itch (score 1-10): p=0.458; Patients with mild/moderate itch (score 1-5) vs. patients with intense/severe itch: p=0.057. Sézary cells ≤5% lymphocytes vs. SC >5% lymphocytes: p=0.242. Sézary cells <1000/ml vs. SC ≥ 1000/μl: p=0.024. Stages I+II vs. Stages III+IV: p=0.242.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – IL-31 (panel A) and IL-8 (panel B) serum levels (pg/ml) accordingly to the diagnosis and accordingly to the severity of itch.

In this figure, 2 outliers were excluded for IL-31 (2 patients with IL-31 serum levels higher than 200 pg/mL), and 1 outlier was excluded for IL-8 (1 patient with IL-8 higher than 200 pg/mL).

The statistical analysis was performed using the Mann Whitney U Test. Statistics excluding the outliers: IL-31 – CTCL vs Controls: $p=0.068$; CTCL with itch vs CTCL without itch: $p=0.033$; IL-8 – CTCL vs Controls: $p=0.952$; CTCL with itch vs CTCL without itch: $p=0.411$. Statistics without excluding the outliers: IL-31 – CTCL vs Controls: $p=0.021$; CTCL with itch vs CTCL without itch: $p=0.010$; IL-8 – CTCL vs Controls: $p=0.870$; CTCL with itch vs CTCL without itch: $p=0.459$.

Abbreviations: CTCL, Cutaneous T cell lymphoma; MF, Mycosis Fungoides; SS, Sézary Syndrome.

Figure 2 – Correlations between the IL-31 serum levels (pg/ml) and LDH (U/L) (panel A), B2MG (ng/L) (panel B), phenotypically abnormal Sézary cells (cells/ μ l) (panel C), and itch VAS score (0 – 10 points) (panel D).

For the calculations showed in this figure, 2 outliers were excluded for correlations involving IL-31 (2 patients with IL-31 serum levels higher than 200 pg/mL).

The statistical analysis was performed using the Spearman's Rank Test. Statistics without excluding the outliers: DHL vs. IL-31 ($p<0.001$; $R=0.680$); B2M vs. IL-31 ($p=0.002$; $R=0.609$); SC count/ μ l vs. IL-31 ($p<0.001$; $R=0.642$); and VAS score vs. IL-31 ($p<0.001$; $R=0.675$).

Abbreviations: B2M, Beta 2 microglobulin; CTCL, Cutaneous T cell lymphoma; IL, Interleukin; LDH, Lactate dehydrogenase.

Figure 3 – Correlations between the IL-8 serum levels (pg/ml) and the absolute number of neutrophils (panel A) and monocytes (panel B), and IL-31 serum levels (pg/ml) (panel C), in patients with CTCL.

For the calculations showed in this figure, 2 outliers were excluded for correlations involving IL-31 (2 patients with IL-31 serum levels higher than 200 pg/mL), and 1 outlier was excluded for correlations involving IL-8 (1 patient with IL-8 higher than 200 pg/mL, corresponding a patient with hyperleukocytosis).

The statistical analysis was performed using the Spearman's Rank Test. Statistics without excluding the outliers: IL-8 vs. Neutrophils ($p=0.009$; $R=0.477$), IL-8 vs. monocytes ($p=0.049$; $R=0.369$), and IL-8 vs. IL-31 ($p=0.037$; $R=0.396$).

Abbreviations: IL, Interleukin.

FIGURES

Figure 1

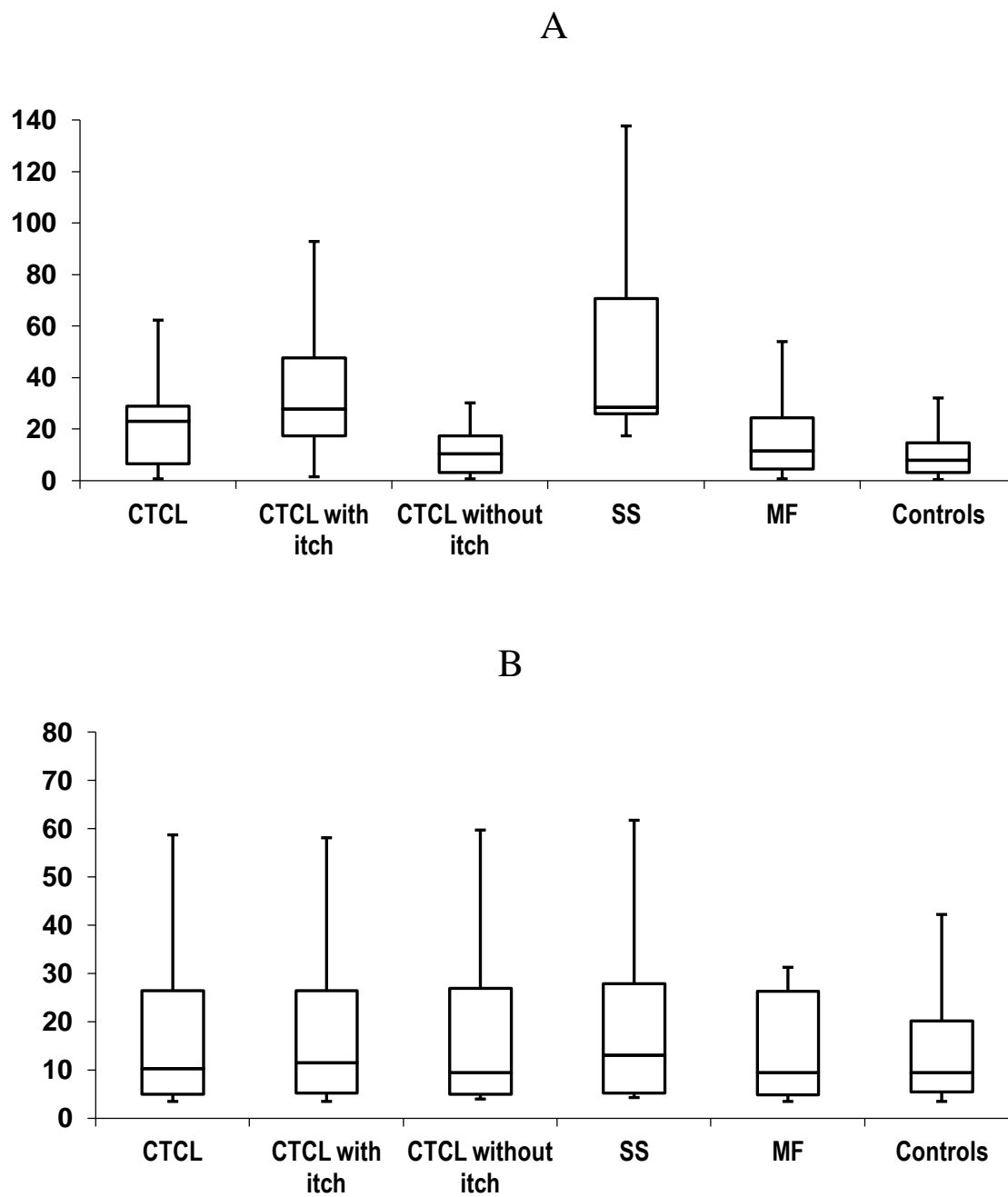


Figure 2

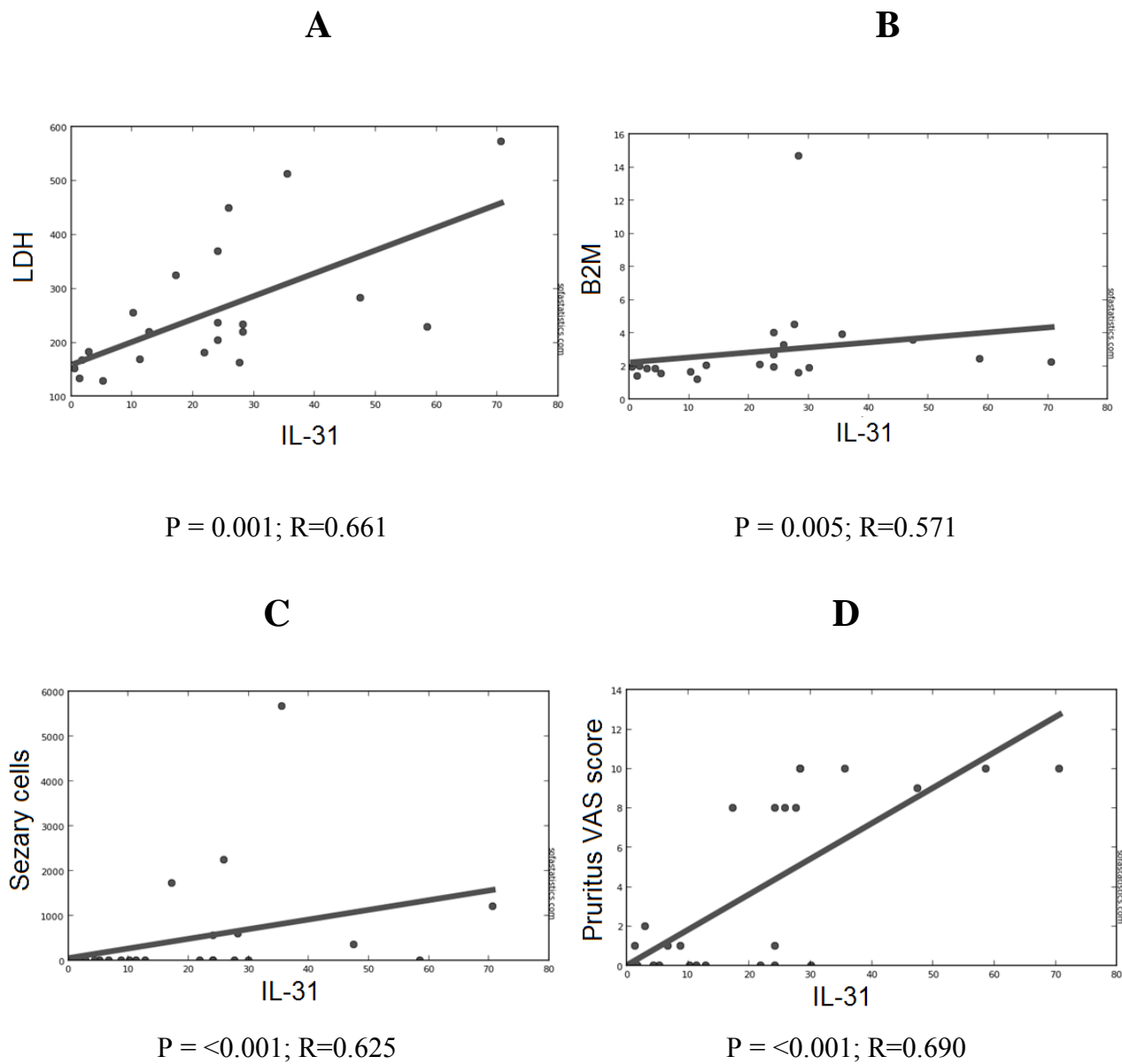
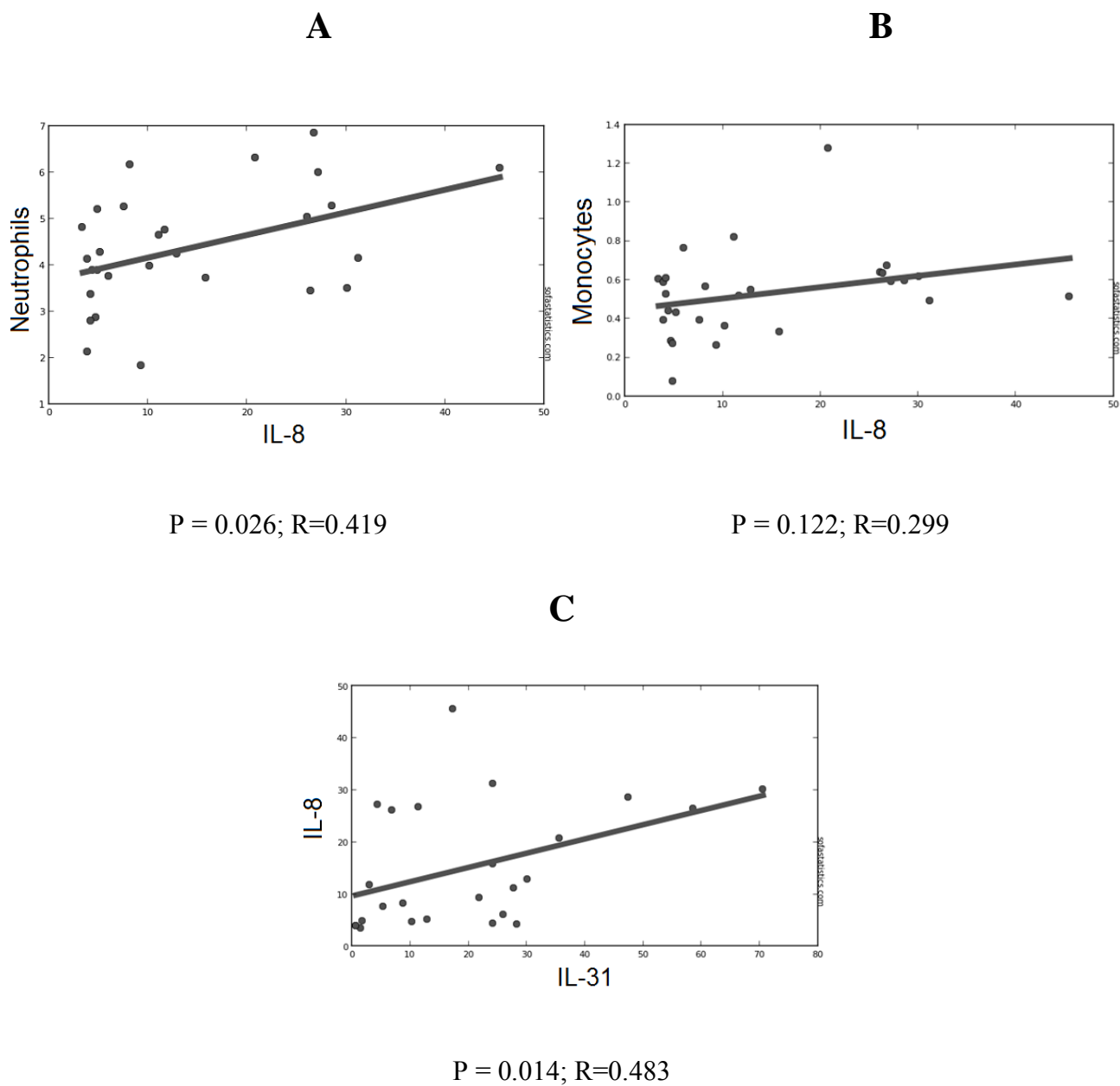


Figure 3



PARTE 2. TRABALHO PARA APRESENTAR EM REUNIÃO CIENTÍFICA

Nesta secção é exposto um trabalho submetido para apresentação na forma de *poster* em reunião científica da área da Hematologia.

INTERLEUCINA 31 Y PRURITUS ASOCIADO A LOS LINFOMAS CUTANEOS DE CELULAS T

LVIII Congreso Nacional de la SEHH” e “XXXII Congreso Nacional de la SETH”

Local: Santiago de Compostela, Espanha.

Data: 20 a 22 de Outubro de 2016.

Área temática: Hematologia / Linfomas

Forma de apresentação: *Poster*.

ABSTRACT

INTERLEUCINA 31 Y PRURITUS ASOCIADO A LOS LINFOMAS CUTANEOS DE CELULAS T

Abreu, Maria¹; Castro, Mafalda^{1,2,3,7}; Cabral, Renata^{2,3}; Fernandes, Iolanda^{2,4}; Leander, Magdalena^{3,6,7}; Santos, Ana Helena^{3,6,7}; Fonseca, Sónia^{3,6,7}; Miranda, Marta⁸; Lau, Catarina^{3,6,7}; Freitas, Inês^{5,7}; Coimbra, Susana^{8,9}; Santos Silva, Alice⁸; Lima, Margarida^{1,2,3,6,7}

¹Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP), Porto, Portugal.

²Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos e Mastocitoses (CMLC), Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

³Serviço de Hematologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁴Serviço de Dermatologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁵Departamento de Patologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁶Laboratório de Citometria, Serviço de Hematologia, Hospital de Santo António (HSA), Centro Hospitalar do Porto (CHP), Porto, Portugal.

⁷Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (UMIB/ICBAS/UP), Porto, Portugal.

⁸UCIBIO\REQUIMTE, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Bioquímica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto (FFUP), Porto, Portugal.

⁹CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (IINFATS), Gandra-Paredes, Portugal.

Introducción: El prurito es uno de los principales síntomas presentes en los linfomas cutâneos de células T (LCCT), pero al ser poco conocidos los mecanismos implicados, el enfoque terapéutico no es consensual. Estudios previos han valorado el papel de la interleucina -31 (IL-31), una citoquina producida principalmente por células T *helper* 2, en la génesis del prurito asociado a la dermatitis atópica y LCCT, aunque los resultados en los LCCT son controvertidos. Nuestro objetivo es probar si la IL-31 desempeña un papel en la patogénesis del prurito asociado con LCCT y inferir sobre su potencial como diana terapéutica.

Métodos: En el estudio participaron 29 pacientes con LCCT – Micosis Fungóide (MF) 17 pacientes; Síndrome de Sézary (SS) 10 pacientes; otros LCCT 2 pacientes) – y 29 controles sanos (donantes de sangre). La mediana de edades de los pacientes fue de 66 años, variando de 36 a 90 años, y la mediana de edades de los controles fue de 59 años, variando entre los 50 y los 67 años. Quince pacientes (51.7%) y 14 controles (48.3%) eran hombres. La población de estudio suministró

muestras de sangre para determinar las concentraciones séricas de IL-31 por ELISA, y los pacientes con LCCT fueron sometidos a examen clínico, calificaron su prurito a través de una escala analógica visual (VAS, puntuación de 0-10) y proporcionaron una segunda muestra de sangre para el recuento de células sanguíneas, citometria de flujo y estudio bioquímico. Los testes estadísticos usados fueron el Mann-Whitney U test y el Spearman's Rank Test.

Resultados: Las concentraciones de IL-31 en el suero fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles ($p = 0.021$) y mayores en los pacientes con SS que en aquellos con MF ($p = 0.005$). También fueron significativamente mayores en los pacientes con prurito que en los que negaron ($p = 0.01$), y significativamente mayores en pacientes que se quejaron de prurito intenso / severo (VAS 6-10) que en aquellos con prurito leve / moderado (VAS 1-5) ($p = 0.039$). Además, se observó una correlación positiva entre los niveles séricos de IL-31 y los niveles séricos de lactato deshidrogenasa ($p < 0.001$; $R = 0.680$) y de beta-2 microglobulina ($p = 0.002$; $R = 0.609$), así como con el número de células de linfoma en la sangre periférica ($p < 0.001$; $R = 0.642$).

Conclusiones: Se concluye que el prurito asociado con LCCT se relaciona con los niveles séricos de IL-31, lo cual coincide con algunos estudios previos, y como tal, puede desempeñar un papel digno de enfoque terapéutico.

Fuentes de financiación: ICBAS/UP; IPCTN, CESPU; UMIB/ICBAS/UP; UCIBIO, REQUIMTE.

APÊNDICES

PROPOSTA DE PROJETO DE INVESTIGAÇÃO

PLANO CIENTÍFICO

Introdução

O prurido é, por definição, uma sensação desagradável referida às superfícies cutânea ou mucosa, que desperta vontade de coçar [1]. Pode ser uma reacção fisiológica a um estímulo lesivo, ou pode ser patológico [2]. Neste último caso, é um sintoma inespecífico e pode estar associado a uma grande variedade de doenças dermatológicas, sistémicas, neurológicas, neuropáticas e psiquiátricas [3].

Foram estudados diversos mediadores do prurido, dos quais a histamina é o mais conhecido. Esta tem receptores comprovadamente relacionados com o prurido, como os H1, presentes nos gânglios da raiz dorsal [4].

A histamina provoca libertação de neuropeptídeos vasodilatadores, nomeadamente a substância P (SP) e o péptido relacionado com a calcitonina (CGRP, *calcitonin gene related peptide*), que causam eritema local (*flare*). Estima-se que outros mediadores possam regular a sensibilidade neuronal à histamina, como é o caso da capsaicina [5]. No entanto, existem situações de prurido independente da histamina, como é o caso do prurido desencadeado pelo feijão da Flórida e pela cloroquina. Face a esta evidência, à importância da histamina na génese de alguns tipos de prurido e às suas implicações terapêuticas, é comum considerar dois tipos de prurido, histaminérgico e não histaminérgico.

São vários os mediadores potencialmente envolvidos no prurido não histaminérgico, nomeadamente a SP, que se admite ter um papel em ambos os tipos de prurido [6], a serotonina [7], as prostaglandinas, como a prostaglandina E2 (PGE2) [8], [9], o péptido libertador de gastrina (GRP, *gastrin releasing peptide*), proteases, como a tripsina e triptase, os leucotrienos, a acetilcolina, o ácido lisofosfatídico (LPA, *lysophosphatidic acid*) e as interleucinas (IL). Relativamente às interleucinas, é de mencionar a IL-8 e a IL-31, que parecem estar implicadas no prurido da dermatite atópica [10] [11], e que escolhemos como alvo do estudo em causa.

O “percurso” neuroanatômico do prurido é hoje relativamente bem conhecido. Sabe-se que tem início em terminações nervosas cutâneas, que transferem este estímulo a fibras C não mielinizadas, de condução lenta [12]. O percurso passa pelos cornos dorsais da medula, de onde partem para projecções talâmicas através dos feixes anterolaterais da medula, e terá também

projeções para o giro cingulado e cortex dorsal da ínsula, e daí para as áreas pré-motora e motora do córtex cerebral [13].

A abordagem do prurido deve sempre iniciar pela procura da causa subjacente, embora esta nem sempre seja identificável e/ou passível de ser tratada. Para além disso, é importante abordar o prurido enquanto sintoma, devido ao seu importante potencial debilitante, sobretudo em situações crónicas em que a causa não é remediável. Nesta abordagem podem ser usados tratamentos tópicos ou sistémicos [14]. Os tratamentos tópicos incluem, nomeadamente, fármacos anti-inflamatórios, como é o caso dos corticosteróides, anti-histamínicos, inibidores da calcineurina (tacrolimus e pimecrolimus), vitamina D3 e análogos (calcipotriol), antidepressivos tricíclicos com acção anti-histamínica (ex. doxepina), anestésicos (ex. capsaicina), e fármacos com ação refrigerante, como mentol cânfora. Também aqui podemos mencionar a fototerapia, que pode ser extremamente eficaz para prurido com origem cutânea. Os tratamentos sistémicos abrangem anti-histamínicos, corticosteróides, imunossuppressores como a ciclosporina A, anti-depressivos e anti-convulsivantes, talidomida, antagonistas e agonistas opióides (antagonistas μ e agonistas κ), entre outros. Não menos importante é a abordagem comportamental e psicológica, para ajudar o doente a lidar com o prurido e a ter hábitos e cuidados minimizadores deste sintoma [14].

Os linfomas cutâneos de células T (LCCT) representam cerca de 20% dos linfomas não Hodgkin extra-ganglionares. As formas mais comuns são a Micose Fungóide (MF) e a Síndrome de Sezary (SS) [15] e ambas podem cursar com prurido particularmente debilitante. [16]. À semelhança do que acontece com outras patologias sistémicas, na abordagem do prurido associado aos linfomas cutâneos deve começar-se por tratar a doença. Para esse fim está disponível uma grande variedade de tratamentos tópicos, como corticosteróides, retinóides e fototerapia, assim como de tratamentos sistémicos como interferons, retinóides sintéticos, inibidores da desacetilase das histonas, imunotoxinas, anticorpos monoclonais e vários esquemas de quimioterapia [17]. No entanto, os LCCT são em regra patologias crónicas e recidivantes, e os objetivos raramente são curativos. Neste contexto, o tratamento sintomático de prurido associado aos LCCT é pertinente, e pode incluir praticamente todas as alternativas terapêuticas para o prurido acima referidas. No entanto, raramente eficaz, já que, nestes casos, o prurido é geralmente de natureza não histaminérgica e particularmente resistente ao tratamento.

Com este estudo pretendemos avaliar em que medida a IL-8 e a IL-31 estão envolvidas no prurido associado aos LCCT, com o objetivo de identificar novos alvos terapêuticos potenciais.

Enquadramento teórico / Estado da arte

Prurido

Definição

O prurido é uma sensação desagradável na pele ou nas mucosas, que desperta vontade de coçar. [1] Pode ser uma reacção fisiológica a uma agressão, tendo como objetivo afastar o estímulo lesivo, [2] mas pode também ser patológico, uma resposta mal adaptativa a alguma patologia subjacente. Enquanto sintoma, é inespecífico, podendo estar presente numa grande variedade de doenças dermatológicas, sistémicas, neurológicas e neuropáticas e até psiquiátricas. [3], [18] O prurido é também um sintoma de estudo difícil. Por um lado, os seus mecanismos não são comprovadamente os mesmos ao longo da cadeia filogenética, sendo difícil a validação de resultados com experiências em animais; por outro, parecem existir diferentes mecanismos e diferentes tipos de prurido; finalmente, a própria reacção ao prurido difere de indivíduo para indivíduo; são observados diferentes tipos de comportamentos, como a substituição do coçar pelo esfregar ou expor a diferentes temperaturas.[14]

Prurido e Dor

O prurido e a dor são sensações distintas, mas têm muito em comum. Ambos são desagradáveis, embora um incite uma vontade de coçar e o outro desencadeie um reflexo de retração [19]. Apresentam algum antagonismo, visto que a dor ligeira resultante do ato de coçar faz cessar o prurido, e que os opióides μ inibem a dor e provocam prurido (curiosamente os opióides κ têm o efeito oposto no prurido). Sabe-se, por outro lado, que diversos estímulos pruritogénicos provocam dor, quando se aumenta a sua intensidade. Foi inclusive proposto que o prurido e a dor fossem diferentes intensidades do mesmo sintoma, referindo-se esta teoria como “teoria da intensidade”. Esta teoria, no entanto, não explica as diferentes gradações de dor e prurido e que um não começa obrigatoriamente quando outro acaba. Aparentemente, os estímulos pruritogénicos "puros" provocam graus crescentes de prurido sem provocar dor, e o oposto verifica-se para os estímulos nociceptivos "puros". Assim, hoje acredita-se que existe especificidade, defendendo-se a existência de receptores e substâncias distintas envolvidas nas duas sensações. Tal não significa, no entanto, que sejam independentes; para além do supra-referido "antagonismo", já que estímulos nóxicos afetam a sensibilidade a estímulos pruritogénicos, e o inverso também se verifica.

Mediadores

Histamina

O mediador pruritogéneo mais conhecido é a histamina. Esta é naturalmente libertada pelos mastócitos, e estima-se que esteja envolvida na maioria das reações de prurido. Foram identificados vários recetores para a histamina, todos eles acoplados a proteínas G, aos quais nos referimos como receptores H1 a H4. O recetor H1 (H1R) e, em menor grau os recetores H3R e H4R, estão envolvidos no prurido [20]. Os efeitos do H1R são mediados pela fosfolipase C β 3 (PLC β 3), [21] sendo que animais deficientes nesta enzima não têm a mesma resposta à estimulação com histamina ou serotonina,[22] e foi este detetado nos gânglios da raiz dorsal, que faz parte do trajeto neuronal do prurido.[18]

Após ativação pela histamina, os nociceptores que lhe são específicos causam a libertação de neuropeptídeos vasodilatadores, como a SP e CGRP, que provocam vasodilatação local e eritema, o dito *flare*. [23] conforme citado em Por outro lado, a injeção de SP por via intradérmica provoca prurido, que pode resultar da desgranulação dos mastócitos, com libertação de histamina.

Os efeitos da histamina são condicionados por outros mediadores. Por exemplo, a capsaicina, substância ativa da malagueta que estimula terminais dolorosos da língua e provoca o conhecido sabor "picante", é um estímulo nóxico considerado "puro", e o seu recetor é o TRPV1 (*Transient Receptor Potential cation channel, subfamily Vanilloid, member 1*), que está relacionado com o prurido histaminérgico em ratinhos [24]. A inativação de neurónios possuindo o receptor TRPV1 via administração intradérmica de capsaicina reduz comportamentos de coceira em ratinhos, [22] pelo que o recetor em si aparenta localizar-se nos mesmos neurónios que os recetores H1, e ratinhos tratados com antagonistas seletivos deste recetores também apresentam redução significativa de coceira, podendo a influência destes receptores no prurido ter um papel na sensibilização neuronal à histamina. Faz sentido considerar um eventual papel sensibilizante da capsaicina sobre a via histaminérgica do prurido[25] A administração intradérmica de capsaicina também suprime também o *flare*.^{[14] [24]}

Aparentemente, no entanto, nem todos os tipos de prurido estão associados à histamina. O primeiro exemplo desta exceção é o prurido induzido pelo feijão-da-Flórida, uma planta cujas folhas possuem espículas altamente pruriginosas. Os anti-histamínicos não aliviam o prurido induzido por esta planta, que também não causa *flare*, sugerindo que a histamina não é um mediador envolvido [27]. O mesmo se verifica para a cloroquina, um antimalárico. Esta resistência aos anti-histamínicos

verifica-se também em algumas patologias crônicas pruriginosas, sugerindo que estejam envolvidos outros mediadores, o que dirigiu a investigação a pesquisar alternativas terapêuticas. Estas descobertas são coerentes com a descoberta que ratinhos PLC β 3 *knock-out*, que supostamente não têm recetores H1 ativos, não têm redução do comportamento de coceira face alguns pruritogénicos, como a cloroquina [22].

Substancia P (SP)

Para além de estimulada pela histamina, pondera-se que a própria SP possa apresentar um papel na libertação de histamina. A administração subcutânea de SP provoca prurido em indivíduos normais,[23] mas não se sabe até que ponto é que este é ou não histaminérgico. A SP provoca desgranulação mastocitária e o prurido causado pela administração subcutânea de SP diminui com anti-histamínicos. A SP ativa os receptores da neuroquinina 1 (NK-1R, *neurokinin 1 receptor*) nos mastócitos e nos queratinócitos da pele, pensando-se que este é um dos mecanismos subjacentes ao prurido induzido pela SP. O aprepitant, um antiemético que inibe seletivamente estes recetores, tem efeito anti-pruriginoso.[28]

Prostaglandinas

Outros mediadores envolvidos no prurido são as prostaglandinas, aparentemente capazes de produzir prurido histaminérgico e não-histaminérgico. A prostaglandina E2 (PGE2) também causa prurido, quando aplicada topicamente ou na conjuntiva [20], [21] e parece estimular seletivamente os aferentes de neurónios respondedores à histamina.[29]

Serotonina

A serotonina, ou 5-hidroxitriptamina (5-HT), é uma amina biogénica com comprovado efeito pruritogénico ratinhos e em humanos. [30] Atua nos receptores 5-HT (*5-hydroxytryptamine receptors*), dos quais se conhecem vários tipos, a maioria dos quais pertence à família dos receptores acoplados proteína G (*GPCR, G-protein-coupled receptors*). Um dos recetores da serotonina que tem sido relacionado com o prurido, pelo menos nos ratinhos, é o 5-HT2.[18]

Estudos em ratinhos demonstraram que os linfócitos T não só possuem receptores para a serotonina e são ativados por este mediador como são, eles próprios capazes de sintetizar serotonina (PMID:17158224).

Péptido libertador de gastrina (GRP)

Este péptido tem especial importância no prurido não histaminérgico, atuando aparentemente nas fibras C polimodais (discutidas abaixo). Localiza-se nos neurónios superficiais dos cornos dorsais da medula, e, em ratinhos, a sua ausência leva a uma redução de prurido não acompanhado de dessensibilização à dor.

Proteases

As serino-proteases, como a tripsina e a triptase, provocam prurido em humanos via ativação de recetores ativados pelas proteases (PAR, *protease activated receptors*). [32] Os PAR são recetores acoplados à proteína G presentes nas fibras nervosas aferentes, [33] que requerem clivagem por uma protease para ativação. Os mastócitos são fonte de triptase [34], ativadora do PAR2 [35], e o feijão-da-Flórida contém mucunina, que também é uma protease ativadora do PAR2, podendo isto significar que as proteases estão envolvidas em ambos os tipos de prurido, histaminérgico e não histaminérgico.

Interleucinas (IL)

Merecem especial atenção a IL-6 e a IL-8, associadas respetivamente a doença renal crónica e dermatite atópica, [36, p. -8][37] e a IL-31, com níveis séricos aumentados em situações imunoalérgicas, como a dermatite atópica e dermatite de contato, [11, p. 31], [38, p. -31], [39, p. 31]. Esta última é produzida pelos linfócitos T e atua a diversos níveis, sendo possível que tenha uma acção direta nos terminais nervosos. [38]

Outros mediadores

Outros mediadores, como os leucotrienos, a acetilcolina e o LPA, também foram constatados como pruritogénicos em determinado contexto.

Neuroanatomofisiologia do prurido

Estima-se que o prurido tenha origem em terminais nervosos, tipicamente cutâneos. De acordo com estudos atuais, é conduzido via fibras C. Embora as fibras C mais conhecidas, ditas "polimodais" ou mecano e termosensíveis (CMiHi, *C fibers mechanical and heat sensitive*), tenham fraca resposta a histamina em ratinhos (o mesmo pode não se verificar em humanos), uma classe de fibras C, ditas mecano e termo-insensíveis (CMiHi, *C fibers mechanical insensitive and heat insensitive*), de velocidade de condução lenta, têm uma forte resposta à histamina, e um forte potencial pruritogénico [40] Mais, assumindo funções diferentes por parte destes dois subtipos de fibras C, podemos considerar que eventualmente as fibras CMH exerçam uma acção inibitória sobre

as fibras CMiHi, justificando-se a inibição do prurido aquando do estímulo doloroso. As fibras CMiHi também possuem recetores para e respondem a estímulos nocicetivos como capsaicina e bradicinina em humanos [29]. A capsaicina, quando administrada por via intradérmica em níveis sobrefisiológicos possibilita, inclusive, uma dessensibilização, tanto a estímulos nocicetivos como histaminérgicos, pelo que se pensa ser ativação VPR1.

Julga-se que as fibras CMiHi, também referidas como neurónios pruritogénicos, têm conexões com os cornos dorsais da medula. Os neurónios de segunda ordem aqui localizados têm projecções talâmicas, estabelecendo assim uma via específica do prurido. Esta estende-se dos aferentes cutâneos, para a medula espinal, [41] projeta-se através dos feixes antero-laterais em conjunto com a dor e temperatura (dado que cordotomia abole prurido, assim como sensibilidade termoálgica)[42] e trato subtalâmico [43] na substância branca medular até à porção médio-caudal do ao núcleo medial ventral, e daí terá projecções para o giro cingulado e córtex dorsal da ínsula.

No entanto, é provável que as fibras CMH também estejam envolvidas na génese do prurido, já que o anteriormente referido feijão-da-Flórida ativa fibras C polimodais no gato.

As regiões cerebrais que, em situações de prurido provocado pela histamina, evidenciam sinais de ativação na ressonância magnética e na tomografia por emissão de positrões (PET, *positron emission tomography*) incluem o giro cingulado anterior, o córtex da ínsula, as regiões pré-motora e motora suplementar (o que faz sentido, considerando o coçar reativo), o cerebelo, o córtex somato-sensorial primário e o tálamo, [10], [11] não diferindo muito do padrão de ativação em situações dolorosas.[46] A exceção abre-se para a substância cinzenta periaquedutal não ativada, que parece ter uma função inibitória sobre o prurido, sendo, curiosamente estimulada por estímulos dolorosos [2].

Classificação do prurido

O prurido pode ser classificado de acordo com a duração em agudo ou crónico, conforme duração superior ou inferior 6 meses respetivamente, [37] e conforme a origem, em dermatológico, sistémico, neurológico, psicogénico, ou misto (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação do prurido quanto à sua origem

Doenças dermatológicas	Doenças sistémicas	Doenças neurológicas	Doenças psiquiátricas
<input type="checkbox"/> Xerose <input type="checkbox"/> Alergias <input type="checkbox"/> Dermatite atópica <input type="checkbox"/> Dermatofitoses e Parasitoses <input type="checkbox"/> Líquenes <input type="checkbox"/> Psoríase <input type="checkbox"/> Penfigóide	<input type="checkbox"/> Doença renal <input type="checkbox"/> Colestase <input type="checkbox"/> Medicamentos <input type="checkbox"/> Neoplasias <ul style="list-style-type: none"> ○ Linfomas cutâneos e outras neoplasias hematológicas (Linfoma de Hodgkin, Policitemia Vera, etc.) ○ Neoplasias não hematológicas (ex. carcinoma gástrico) <input type="checkbox"/> Doenças endócrinas <input type="checkbox"/> Infecções víricas (ex. VIH) <input type="checkbox"/> Doenças do tecido conjuntivo <input type="checkbox"/> Doenças autoimunes	<input type="checkbox"/> Alterações de sensibilida de	<input type="checkbox"/> Depressão <input type="checkbox"/> Escoriação psicogénica <input type="checkbox"/> Parasitose delusional <input type="checkbox"/> Anorexia nervosa

Como a histamina não está envolvida em todos os tipos de prurido e a terapêutica sintomática se baseia frequentemente na utilização de anti-histamínicos, o prurido é frequentemente dividido em dois tipos - histaminérgico e não histaminérgico.

Abordagem do prurido

A abordagem de prurido deve, obviamente, iniciar sempre pela investigação da causa subjacente, e após identificação, pelo seu tratamento.

O prurido associado às doenças sistémicas raramente é fisiológico, e tende a manter-se durante longos períodos de tempo [2] [14]. Por poder ser altamente debilitante e causa importante de morbilidade e redução da qualidade de vida, particularmente em situações crónicas, é importante a abordagem sintomática. Esta baseia-se em tratamentos tópicos e sistémicos (Quadro 2).[14]

Quadro 2. Abordagem sintomática do prurido

Terapia Tópica	Terapia sistémica
Para patologias com afecção dermatológica. Estão disponíveis na forma de loções, cremes, espumas e óleos. Podem ser aplicados com ou sem oclusão.	Estão disponíveis para diversas formas de administração (oral)
<ul style="list-style-type: none"> • Corticosteróides • Anti-histamínicos • Inibidores da calcineurina • Antidepressivos tricíclicos (doxepina, amitriptilina) • Anestésicos (capsaicina) • "Esfriantes": mentol, cânfora, gelo, anestésicos tópicos • Fototerapia 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-histamínicos • Corticosteróides • Outros imunossupressores (ex. ciclosporina A) • Antidepressivos: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Inibidores da recaptação da serotonina ▪ Inibidores da recaptação da norepinefrina ▪ Tricíclicos ▪ Tetracíclicos ▪ Antagonistas da serotonina • Anticonvulsivantes (gabapentina e pregabalina) • Talidomida • Antagonistas dos opióides (μ) • Agonistas opióides (κ) • Antagonistas do receptor dos leucotrienos
Terapias de apoio psicológico	

Prurido nos linfomas cutâneos de células T

Os linfomas cutâneos primários representam cerca de 20% dos linfomas de não Hodgkin extra-ganglionares, e têm manifestações clínicas e histológicas muito variadas. As formas de apresentação mais comuns são a Micose Fungóide (MF) e a Síndrome de Sezary (SS). [47] A MF manifesta-se predominantemente na pele, mas nas fases mais avançadas da doença pode envolver os gânglios, a medula óssea, o sangue periférico ou os órgãos viscerais. As lesões cutâneas podem manifestar-se como, manchas, pápulas, placas ou tumores cutâneos, localizados ou disseminados, e por vezes, por eritroderma. A SS tem manifesta-se tipicamente por eritrodermia generalizada, sendo a presença de células de linfoma no sangue requerida para diagnóstico.

O estadiamento clínico da MF e a SS baseia-se nos parâmetros TNMB, referentes ao envolvimento da pele (T, *tumor*), gânglios linfáticos (N, *nodules*), órgãos viscerais (M, *metastasis*) e sangue (B, *blood*). A classificação ISCL está adaptada para malignidade sanguínea tem valor prognóstico significativo [48], e a abordagem de MF varia inclusive conforme este estadiamento.

O prurido é frequentemente acentuado, particularmente nos estadios avançados de ambas as patologias, mas sobretudo na SS. Estima-se que 60-70% dos doentes com MF ou SS apresentem prurido, percentagem que sobe para mais de 80% nos estadios avançados. O prurido é mais prevalente e mais debilitante na SS do que na MF^[45], e aparenta inclusive ser inversamente proporcional à sobrevida.[49]

À semelhança das outras patologias causadoras de prurido crónico, a abordagem terapêutica do prurido associado a linfoma cutâneo começa por tratar a doença. Os tratamentos existentes são diversos e não consensuais. Os corticosteróides potentes são frequentemente utilizados, por via tópica, durante toda a duração da doença, e são especialmente eficazes nos estados iniciais de MF. Para casos de doença localizada, os retinóides tópicos podem auxiliar ao tratamento na fase inicial, embora produzam frequentemente irritação local.^[39] A fototerapia também é utilizada, podendo ser utilizada radiação UVA ou UVB. Na SS pode estar indicada a fotofereze extracorporal. Entre os tratamentos sistémicos disponíveis salienta-se o interferão alfa (IFN- α), os retinóides sintéticos (ex. bexaroteno), os inibidores das desacetilases das histonas (ex. vorinostat) e diversos esquemas de mono e poliquimioterapia. [51][52]

Finalmente, o tratamento sintomático do prurido é aplicável a situações de linfoma, mas não existem algoritmos universalmente aceites. Apesar de não ser um quadro essencialmente dermatológico, o cuidado com hidratação da pele deve ter sempre lugar; evitar roupas com tecidos irritativos também é indicado. [53][49]

A abordagem sintomática é muito difícil, já que o prurido associado aos LCCT raramente responde aos anti-histamínicos, assumindo-se, por isso, que provavelmente tem origem não histaminérgica. Os corticosteróides orais podem ser utilizados, mas os seus efeitos secundários devem ser ponderados. A abordagem do prurido passa pelos antidepressivos, como a mirtazapina, que atua ao nível dos receptores 5HT e altera as concentrações sinápticas de serotonina, com alívio do prurido em alguns casos. Os anti-convulsivantes, gabapentina e pregabalina, também têm acção anti-pruriginosa e podem estar indicados nos casos com prurido resistente às outras terapêuticas. [41] A naloxona e naltrexona não têm evidência terapêutica nesta patologia. Finalmente, há alguma evidência de sucesso com talidomida e com o aprepitant, um anti-emético com acção inibidora dos recetores NK-1R, apesar dos mecanismos através dos quais este exerce acção sejam mal compreendidos. [28] [55]

Problemas

Os doentes com LCCT sofrem frequentemente de prurido crónico que pode ser intenso e debilitante e que geralmente é resistente aos tratamentos convencionais, nomeadamente aos anti-histamínicos.

Questões

Quais são os mediadores envolvidos no prurido associado aos LCCT?

As interleucinas, como a IL-8 e a IL-31, terão algum papel na sua génese?

Objetivos do estudo

Determinar as concentrações séricas de IL-8 e de IL-31 em doentes com LCCT e compará-las com as encontradas em indivíduos normais.

Avaliar se existe relação entre a concentração sérica destes mediadores e a intensidade do prurido, avaliado por uma escala analógica numérica, em doentes com LCCT.

Avaliar se existe relação entre a concentração sérica destes mediadores e a quantidade de células de linfoma no SP dos doentes com LCCT.

Inferir sobre potenciais alvos terapêuticos para o prurido associado aos LCCT

Intervenientes

Instituições, Departamentos e Serviços

- ☐ Centro Hospitalar do Porto (CHP), Hospital de Santo António (HSA).
 - Departamento de Medicina (DM)
 - Serviço de Hematologia Clínica (SHC).
 - Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos (CMLC)
 - Laboratório de Citometria (LC)
- ☐ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS) da Universidade do Porto (UP), (ICBAS/UP)
- ☐ Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP)
 - Departamento de Ciências Biológicas
 - Laboratório de Bioquímica (LB)

Equipa de Investigação

Constituição

Aluno

- ☐ Maria Abreu: aluna da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP

Supervisora da DIIC

- ☐ Prof. Doutora Margarida Lima: médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, SHC do HSA/CHP; doutorada em Ciências Médicas; professora Auxiliar convidada do ICBAS/UP; investigadora da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB/ICBAS/UP); regente da DIIC.

Orientadores do projeto

- ☐ Prof. Doutora Margarida Lima: médica, especialista em Imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, SHC do HSA/CHP; doutorada em Ciências Médicas, professora auxiliar convidada do ICBAS/UP; investigadora da UMIB/ICBAS/UP; regente da DIIC. (Orientadora)
- ☐ Prof. Doutora Alice Santos Silva: licenciada em Ciências Farmacêuticas; doutorada em Ciências Farmacêuticas, especializada em Bioquímica; professora associada da FFUP; investigadora da UCIBIO / REQUIMTE (Coorientadora)

Outros investigadores

- Prof. Doutora Susana Coimbra: licenciada em Ciências Farmacêuticas; mestre em Controlo de Qualidade; doutorada em Ciências Farmacêuticas; investigadora do Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (IINFATS) e da UCIBIO / REQUIMTE; professora adjunta do Instituto Politécnico da Saúde Norte (IPSN), Cooperativa de Ensino Superior Universitário (CESPU).
- Dra. Mafalda Castro, médica interna de Hematologia Clínica do SHC, HSA/CHP.

Colaboradores

- Enfermeiras do Hospital de Dia e dos Dadores de Sangue do SHC do HSA/CHP.
- Profissionais do LC do SHC do HSA/CHP
- Dr. Marco Sampaio, médico interno de Imunohemoterapia do SHC, HSA/CHP.

Funções e responsabilidades

- A concepção e elaboração da proposta e a execução do projeto são da responsabilidade da aluna;
- A Prof. Margarida Lima, na qualidade de Regente da DIIC, supervisionará todas as fases do projeto.
- A Prof. Doutora Margarida Lima e a Prof. Doutora Alice Santos na qualidade de orientadoras do projeto, acompanharão a aluna na elaboração de proposta, na execução do projeto e na análise e interpretação dos resultados.
- A Prof. Doutora Susana Coimbra, colaborará na execução das técnicas de ELISA para doseamento de citocinas e na análise e interpretação dos resultados.
- Os restantes colaboradores participarão em aspetos específicos do projeto, conforme especificado adiante.

Tempo dedicado ao projeto

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * Mês
Maria Abreu	Aluno	10,0%	22	2,20
Margarida Lima	Supervisora	2,50%	22	0,55
Margarida Lima	Orientadora	2,50%	22	0,55
Maria Alice Santos	Co-orientadora	1,00%	22	0,22
Susana Coimbra	Investigadora	2,50%	4	0,10
Mafalda Castro	Investigadora	2,50%	6	0,15
Profissionais do LC do SHC	Colaboradores	2,50%	4	0,10
Enfermeiras	Colaboradoras	0,50%	4	0,02
Marco Sampaio	Colaborador	0,50%	4	0,02
Total				3,91

Condições e motivações para a realização do estudo

Capacidades instaladas e recursos disponíveis

O estudo decorrerá nas instalações da CMLC, dos Dadores de Sangue e do LC do SHC do HSA/CHP.

A CMLC é uma consulta multidisciplinar de linfomas cutâneos, vocacionada para o diagnóstico e tratamento e seguimento de linfomas cutâneos e mastocitoses. Está certificada segundo as normas ISO 9001:2000, EN ISO 9001:2000 e NP EN ISO 9001:2000 desde Fevereiro de 2004. Nela são realizadas cerca de 400 a 450 consultas / ano, das quais cerca de 25-50 são primeiras consultas, correspondentes a novos casos.

A componente laboratorial do estudo decorrerá em dois laboratórios: o Laboratório de Citometria (LC) do SHC do HSA/CHP e o Laboratório de Bioquímica (LB) da FFUP.

O LC é um laboratório clínico, vocacionado para o estudo de doenças hemato-oncológicas. Está certificada segundo as normas ISO 9001:2000, EN ISO 9001:2000 e NP EN ISO 9001:2000 desde Fevereiro de 2004. Recebe diariamente 10-20 amostras biológicas para estudo, provenientes do CHP e de outras instituições da Região Norte do País, perfazendo um total de cerca de 3.500 amostras/ano. Trabalham no LC vários profissionais da área da saúde (3 médicos, 2 técnicos superiores de saúde e 3 técnicos de diagnóstico e terapêutica) com grande experiência nesta área. Neste laboratório serão recebidas as amostras de sangue e será feita a separação do soro, que será criopreservado até à sua utilização. Como parte integrante dos estudos de rotina, será também feito o hemograma e a quantificação de células de linfoma no sangue periférico, por citometria de fluxo.

O LB da FFUP é um laboratório de investigação aplicada e fundamental que se dedica de entre outros às áreas de bioquímica, imunologia, hematologia e biologia celular e molecular. Neste laboratório serão quantificadas as interleucinas no soro, pelo método de ELISA.

Nestes laboratórios existe o equipamento necessário para a realização do presente estudo, nomeadamente contador hematológico automático, citómetros de fluxo, centrífugas, frigoríficos e arcas congeladoras e leitores de placas de ELISA.

Mérito da equipa de investigação

Nos últimos anos, têm sido realizados no LC do SHC do HSA/CHP e no LI do ICBAS/UP diversos projetos de investigação. Ambas as equipas de investigação têm também apoiado ao longo

do tempo inúmeros trabalhos académicos. Como consequência, contam com mais de 100 artigos publicados em revistas indexadas na MedLine.

O LC do SHC do HSA/CHP integra um grupo de investigação da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB) – Clinical and Experimental Immunology and Immunopathology, CEHIP – e um consórcio europeu, o grupo Euroflow, vocacionado para o diagnóstico imunofenotípico das neoplasias hematológicas. O LB da FFUP integra a unidade UCIBIO/REQUIMTE.

Motivações pessoais para a realização do estudo

Interesse na possibilidade de realizar um projeto de investigação, ainda durante a fase da minha formação académica, particularmente investigação com componentes clínica e laboratorial. Pertinência da abordagem dos sintomas, para além da abordagem da doença, dadas as repercussões na qualidade de vida.

Metodologia

Critérios de revisão da literatura

A revisão de literatura realizada através da pesquisa de artigos publicados na MedLine, através da PubMed, mediante as palavras-chave: “pruritus”, “cutaneous T cell lymphomas”, “mediators”, “histamine”, “IL-31”, “IL-8”. Foram seleccionados artigos em inglês e revistos essencialmente artigos de revisão publicados desde 2000, e ensaios clínicos de diversos níveis de relevância de qualquer data, particularmente quando citados em artigos de revisão.

Desenho do estudo

Tipo de estudo

Estudo de investigação clínica, de âmbito clínico e laboratorial, nacional, institucional, de carácter analítico e de natureza observacional, transversal, de tipo caso-controlo.

Fases do estudo

O estudo será desenvolvido em três fases:

- a) Na 1ª fase os doentes e os dadores de sangue serão convidados a participar no estudo, após ser fornecida informação sobre o mesmo; caso concordem em participar: será pedido que assinem um termo de consentimento informado e que preencham uma escala analógica para avaliação da intensidade do prurido; será preenchido um formulário com dados sócio-demográficos, clínicos e laboratoriais; e será colhida uma amostra de sangue para realização de análises.

- b) Na 2ª fase serão quantificados os níveis séricos de IL-8 e de IL-31, pelo método de ELISA.
- c) Na 3ª fase será feita à análise estatística dos dados e a interpretação dos resultados.

Universo, população e amostra

Universo

Doentes: doentes adultos com LCCT.

Controlos: indivíduos adultos saudáveis.

População

Doentes: doentes com LCCT seguidos na CMLC do HSA, HSA/CHP.

Controlos: dadores benévolos de sangue do SHC do HSA/CHP.

Amostra

Trinta doentes com LCCT; dez controlos

Seleção dos participantes

Serão seleccionados os doentes com LCCT que frequentem a CMLC do HSA/CHP entre junho e setembro de 2015, até atingir o tamanho pretendido para a amostra.

Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão

Doentes: ser doente da CMLC do HSA/CHP; frequentar a consulta entre junho e setembro de 2015; assinar, de forma livre e esclarecida o termo de consentimento informado.

Controlos: ser dador de sangue do HSA/CHP; comparecer para dar sangue entre junho e setembro de 2015; assinar, de forma livre e esclarecida o termo de consentimento informado.

Critérios de exclusão

Doentes: terapêutica em curso dirigida ao tratamento do linfoma ou do prurido, com exceção de medicações tópicas e de anti-histamínicos por via oral; outras doenças potencialmente causadoras de prurido (ex. dermatite atópica).

Controlos: primeiras dádivas; doenças causadoras de prurido (ex. dermatite atópica).

Plano de trabalho

Tarefas associadas ao projeto

Durante a execução do projeto estão previstas as seguintes tarefas:

Nº da tarefa	Designação da tarefa	Data de início	Data de conclusão	Duração (meses)	Investigadores envolvidos
1	Revisão da literatura	09/2014	12/2014	4	Maria Abreu
2	Elaboração da proposta de projeto	01/2015	04/2015	4	Maria Abreu (Margarida Lima)
3	Submissão para aprovação no CHP	05/2015	06/2015	2	Maria Abreu
4	Apresentação da proposta nas JIIC	06/2015	06/2015	1	Maria Abreu
5	Informação sobre o estudo e obtenção de consentimento	07/2015	10/2015	4	Doentes: Margarida Lima Dadores: Marco Sampaio
6	Aplicação da escala para intensidade de prurido	07/2015	10/2015	4	Mafalda Castro (Margarida Lima)
7	Recolha de dados clínicos	07/2015	10/2015	4	Mafalda Castro (Margarida Lima)
8	Colheita de sangue de doentes e controlos	07/2015	10/2015	4	Enfermeiras do Hospital de Dia e dos Dadores de Sangue do CHP
9	Estudo laboratorial de rotina (quantificação de células de linfoma no sangue) *	07/2015	10/2015	4	Profissionais do LC do SHC do CHP
10	Estudo laboratorial de investigação (doseamento interleucinas no soro)	11/2015	11/2015	1	Maria Abreu; Mafalda Castro (Susana Coimbra; Alice Santos)
11	Análise estatística	12/2015	12/2015	1	Maria Abreu
12	Interpretação dos resultados	01/2016	01/2016	1	Maria Abreu; Mafalda Castro (Susana Coimbra) (Alice Santos Silva) (Margarida Lima)
13	Redacção do relatório de execução e/ou de artigo para publicação	02/2016	03/2016	2	Maria Abreu (Margarida Lima)
14	Redação da dissertação de MIM	04/2016	05/2016	2	Maria Abreu (Margarida Lima)
15	Apresentação dos resultados nas JIIC	06/2016	06/2016	1	Maria Abreu
16	Provas de dissertação do MIM	07/2016	07/2016	1	Maria Abreu

Material e métodos

Instrumentos de recolha de dados

No estudo será utilizado, como instrumento de recolha de dados, o formulário de recolha de dados clínicos e laboratoriais que é enviado em anexo.

Procedimentos técnicos

Doseamento de interleucinas: As amostras de sangue colhidas em tubo sem anticoagulante serão centrifugadas e o soro será criopreservado a -80°C até à realização das análises. O doseamento de IL-8 e IL-31 no soro será feito pelo método de ELISA, utilizando *kits* comerciais disponíveis para o efeito, mencionados abaixo. O processamento das amostras será feito de acordo com as instruções dos fabricantes.

Quantificação de células de linfoma no sangue periférico: A quantificação de células de linfoma no sangue periférico será feita por citometria de fluxo. Para esse efeito, as células de sangue periférico serão marcadas com anticorpos monoclonais específicos para diferentes moléculas expressas nos linfócitos T, conjugadas com diferentes fluorocromos, de acordo com os protocolos em vigor no laboratório de citometria.

Reagentes e outros consumíveis

Finalidade	Descrição	Fabricante	Referência	Fornecedor
Doseamento de IL-8 no soro	Legend Max Human IL-8 ELISA kit with pre-coated plates	Biolegend	431507	Grupo Taper
Doseamento de IL-31 no soro	LEGEND MAX Human IL-31 ELISA Kit with pre-coated plates	Biolegend	437307	Grupo Taper

Equipamento

Tipo de equipamento	Marca	Modelo	Local
Contador hematológico	Beckman Coulter	LH780	LC do SHC do HSA/CHP
Citómetro de Fluxo	Becton-Dickinson	FACScanto II	LC do SHC do HSA/CHP
Leitor de placas de ELISA			LB da FFUP

Análise de dados

A análise dos dados será feita através do tratamento estatístico apropriado utilizando o programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) versão 22.0 para o

Windows. Serão usadas formas de estatística descritiva como medidas de distribuição central (medianas) e medidas de dispersão (mínimos, máximos, intervalos interquartis). Além disso, serão também usadas formas de estatística inferencial, usando-se testes não paramétricos para comparar variáveis numéricas contínuas entre dois (Mann-Whitney) ou mais (Kruskal-Wallis) grupos e para comparar as frequências de variáveis entre dois grupos (teste de Qui-Quadrado). Será também usada a correlação de Pearson para procurar a existência de correlação entre variáveis.

Calendarização

Datas de início e conclusão (duração meses)

Global: Setembro de 2014 a Julho de 2016 (22 meses)

Planeamento: Setembro de 2014 a Junho de 2015 (10 meses)

Execução: Junho e Julho de 2015 e Setembro a Julho de 2016 (12 meses)

Cronograma

	ANO LETIVO 2014/2015														ANO LETIVO 2015/2016												
Mês	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07				
Escolha da área	x																										
Integração na equipa	x																										
Escolha do tema e do assunto	x																										
Identificação dos problemas		x																									
Formulação das questões			x																								
Delineamento das hipóteses				x																							
Definição dos objetivos				x																							
Revisão bibliográfica					x	x	x																				
Concepção do estudo						x	x	x																			
Redacção da proposta								x	x																		
Submissão da proposta									x																		
Apresentação da proposta										x																	
Execução do projeto											x	x		x													
Análise dos resultados															x	x	x										
Apresentação dos resultados																						x					
Prova de dissertação do MIM																							x				

Indicadores de produção

Comunicações orais e posters

- Apresentação oral da proposta em reunião do SHC (Junho de 2015)
- Apresentação oral da proposta nas JIIC (Junho de 2015)
- Apresentação oral dos resultados em reunião do SHC (Junho de 2016)
- Apresentação oral dos resultados nas JIIC (Junho 2016)
- Apresentação dos resultados em reunião científica (2016)

Trabalhos escritos

- Proposta de projeto de investigação (Abril de 2015)
- Dissertação de MIM (Maio/Junho de 2016)
- Artigo para publicação em revista médica com arbitragem científica (2016)

Referências bibliográficas

- [1] A. Ikoma, M. Steinhoff, S. Ständer, G. Yosipovitch, e M. Schmelz, “The neurobiology of itch”, *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 7, nº 7, p. 535–547, jul. 2006.
- [2] S. Davidson e G. J. Giesler, “The multiple pathways for itch and their interactions with pain”, *Trends Neurosci.*, vol. 33, nº 12, p. 550–558, dez. 2010.
- [3] R. Twycross, M. W. Greaves, H. Handwerker, E. A. Jones, S. E. Libretto, J. C. Szepietowski, e Z. Zylicz, “Itch: scratching more than the surface”, *QJM Mon. J. Assoc. Physicians*, vol. 96, nº 1, p. 7–26, jan. 2003.
- [4] J. K. Bell, D. S. McQueen, e J. L. Rees, “Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice”, *Br. J. Pharmacol.*, vol. 142, nº 2, p. 374–380, maio 2004.
- [5] M. Schmelz, R. Schmidt, C. Weidner, M. Hilliges, H. E. Torebjork, e H. O. Handwerker, “Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens”, *J. Neurophysiol.*, vol. 89, nº 5, p. 2441–2448, maio 2003.
- [6] O. Hägermark, T. Hökfelt, e B. Pernow, “Flare and itch induced by substance P in human skin”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 71, nº 4, p. 233–235, out. 1978.
- [7] T. Yamaguchi, T. Nagasawa, M. Satoh, e Y. Kuraishi, “Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT2 receptors in mice”, *Neurosci. Res.*, vol. 35, nº 2, p. 77–83, nov. 1999.
- [8] D. F. Woodward, A. L. Nieves, S. B. Hawley, R. Joseph, G. F. Merlino, e C. S. Spada, “The pruritogenic and inflammatory effects of prostanoids in the conjunctiva”, *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 11, nº 3, p. 339–347, 1995.
- [9] O. Hägermark e K. Strandberg, “Pruritogenic activity of prostaglandin E2”, *Acta Derm. Venereol.*, vol. 57, nº 1, p. 37–43, 1977.
- [10] H. Kimata e I. Lindley, “Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis”, *Arch. Dis. Child.*, vol. 70, nº 2, p. 119–122, fev. 1994.
- [11] E. Sonkoly, A. Muller, A. I. Lauerma, A. Pivarsci, H. Soto, L. Kemeny, H. Alenius, M.-C. Dieu-Nosjean, S. Meller, J. Rieker, M. Steinhoff, T. K. Hoffmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik, e B. Homey, “IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 117, nº 2, p. 411–417, fev. 2006.
- [12] M. Schmelz, R. Schmidt, A. Bickel, H. O. Handwerker, e H. E. Torebjörk, “Specific C-receptors for itch in human skin”, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 17, nº 20, p. 8003–8008, out. 1997.
- [13] M. Schmelz, “Itch--mediators and mechanisms”, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 28, nº 2, p. 91–96, fev. 2002.
- [14] M. Steinhoff, F. Cevikbas, A. Ikoma, e T. G. Berger, “Pruritus: management algorithms and experimental therapies”, *Semin. Cutan. Med. Surg.*, vol. 30, nº 2, p. 127–137, jun. 2011.

- [15] P. T. Bradford, S. S. Devesa, W. F. Anderson, e J. R. Toro, “Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases”, *Blood*, vol. 113, nº 21, p. 5064–5073, maio 2009.
- [16] A. Vij e M. Duvic, “Prevalence and severity of pruritus in cutaneous T cell lymphoma”, *Int. J. Dermatol.*, vol. 51, nº 8, p. 930–934, ago. 2012.
- [17] S. M. Horwitz, E. A. Olsen, M. Duvic, P. Porcu, e Y. H. Kim, “Review of the treatment of mycosis fungoides and sézary syndrome: a stage-based approach”, *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN*, vol. 6, nº 4, p. 436–442, abr. 2008.
- [18] L. Han e X. Dong, “Itch Mechanisms and Circuits”, *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 43, nº 1, p. 331–355, 2014.
- [19] G. Yosipovitch, M. W. Greaves, e M. Schmelz, “Itch”, *The Lancet*, vol. 361, nº 9358, p. 690–694, fev. 2003.
- [20] J. K. Bell, D. S. McQueen, e J. L. Rees, “Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in BalbC mice”, *Br. J. Pharmacol.*, vol. 142, nº 2, p. 374–380, maio 2004.
- [21] S.-K. Han, V. Mancino, e M. I. Simon, “Phospholipase C β 3 Mediates the Scratching Response Activated by the Histamine H1 Receptor on C-Fiber Nociceptive Neurons”, *Neuron*, vol. 52, nº 4, p. 691–703, nov. 2006.
- [22] N. Imamachi, G. H. Park, H. Lee, D. J. Anderson, M. I. Simon, A. I. Basbaum, e S.-K. Han, “TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms”, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, nº 27, p. 11330–11335, jul. 2009.
- [23] O. Hägermark, T. Hökfelt, e B. Pernow, “Flare and itch induced by substance P in human skin”, *J. Invest. Dermatol.*, vol. 71, nº 4, p. 233–235, out. 1978.
- [24] J. Wallengren, “Neuroanatomy and neurophysiology of itch”, *Dermatol. Ther.*, vol. 18, nº 4, p. 292–303, ago. 2005.
- [25] W.-S. Shim, M.-H. Tak, M.-H. Lee, M. Kim, M. Kim, J.-Y. Koo, C.-H. Lee, M. Kim, e U. Oh, “TRPV1 Mediates Histamine-Induced Itching via the Activation of Phospholipase A2 and 12-Lipoxygenase”, *J. Neurosci.*, vol. 27, nº 9, p. 2331–2337, fev. 2007.
- [26] D. Wu, H. Doods, K. Arndt, e M. Schindler, “Development and potential of non-peptide antagonists for calcitonin-gene-related peptide (CGRP) receptors: evidence for CGRP receptor heterogeneity”, *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 30, nº 4, p. 468–473, ago. 2002.
- [27] L. M. Johanek, R. A. Meyer, T. Hartke, J. G. Hobelmann, D. N. Maine, R. H. LaMotte, e M. Ringkamp, “Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch”, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, nº 28, p. 7490–7497, jul. 2007.
- [28] A. Duval e L. Dubertret, “Aprepitant as an Antipruritic Agent?”, *N. Engl. J. Med.*, vol. 361, nº 14, p. 1415–1416, out. 2009.
- [29] M. Schmelz, R. Schmidt, C. Weidner, M. Hilliges, H. E. Torebjörk, e H. O. Handwerker, “Chemical Response Pattern of Different Classes of C-Nociceptors to Pruritogens and Algogens”, *J. Neurophysiol.*, vol. 89, nº 5, p. 2441–2448, maio 2003.

- [30] J. Hachisuka, H. Furue, M. Furue, e M. Yoshimura, “Responsiveness of C Neurons in Rat Dorsal Root Ganglion to 5-Hydroxytryptamine-Induced Pruritic Stimuli In Vivo”, *J. Neurophysiol.*, vol. 104, nº 1, p. 271–279, jul. 2010.
- [31] T. Yamaguchi, T. Nagasawa, M. Satoh, e Y. Kuraishi, “Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice”, *Neurosci. Res.*, vol. 35, nº 2, p. 77–83, nov. 1999.
- [32] C. Potenzaieri e B. J. Udem, “Basic Mechanisms of Itch”, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 42, nº 1, p. 8–19, jan. 2012.
- [33] M. Steinhoff, U. Neisius, A. Ikoma, M. Fartasch, G. Heyer, P. S. Skov, T. A. Luger, e M. Schmelz, “Proteinase-Activated Receptor-2 Mediates Itch: A Novel Pathway for Pruritus in Human Skin”, *J. Neurosci.*, vol. 23, nº 15, p. 6176–6180, jul. 2003.
- [34] L. B. Schwartz, “Tryptase, a mediator of human mast cells”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 86, nº 4 Pt 2, p. 594–598, out. 1990.
- [35] G. Barry, G. Le, e D. Fairlie, “Agonists and Antagonists of Protease Activated Receptors (PARs)”, *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, nº 3, p. 243–265, fev. 2006.
- [36] H. Kimata e I. Lindley, “Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis.”, *Arch. Dis. Child.*, vol. 70, nº 2, p. 119–122, fev. 1994.
- [37] S. Ständer e M. Schmelz, “Chronic itch and pain--similarities and differences”, *Eur. J. Pain Lond. Engl.*, vol. 10, nº 5, p. 473–478, jul. 2006.
- [38] Q. Zhang, P. Putheti, Q. Zhou, Q. Liu, e W. Gao, “Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors”, *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 19, nº 5–6, p. 347–356, 2008.
- [39] M. M. Neis, B. Peters, A. Dreuw, J. Wenzel, T. Bieber, C. Mauch, T. Krieg, S. Stanzel, P. C. Heinrich, H. F. Merk, A. Bosio, J. M. Baron, e H. M. Hermanns, “Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis”, *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 118, nº 4, p. 930–937, out. 2006.
- [40] M. Schmelz, R. Schmidt, A. Bickel, H. O. Handwerker, e H. E. Torebjörk, “Specific C-Receptors for Itch in Human Skin”, *J. Neurosci.*, vol. 17, nº 20, p. 8003–8008, out. 1997.
- [41] D. Andrew e A. D. Craig, “Spinothalamic lamina I neurons selectively sensitive to histamine: a central neural pathway for itch”, *Nat. Neurosci.*, vol. 4, nº 1, p. 72–77, jan. 2001.
- [42] J. C. White, W. H. Sweet, R. Hawkins, e R. G. Nilges, “Anterolateral Cordotomy: Results, Complications and Causes of Failure”, *Brain*, vol. 73, nº 3, p. 346–367, set. 1950.
- [43] D. A. Simone, X. Zhang, J. Li, J.-M. Zhang, C. N. Honda, R. H. LaMotte, e G. J. Giesler, “Comparison of Responses of Primate Spinothalamic Tract Neurons to Pruritic and Algogenic Stimuli”, *J. Neurophysiol.*, vol. 91, nº 1, p. 213–222, jan. 2004.
- [44] J. C. Hsieh, O. Hagermark, M. Stahle-Backdahl, K. Ericson, L. Eriksson, S. Stone-Elander, e M. Ingvar, “Urge to scratch represented in the human cerebral cortex during itch”, *J. Neurophysiol.*, vol. 72, nº 6, p. 3004–3008, dez. 1994.

- [45] H. Mochizuki, M. Tashiro, M. Kano, Y. Sakurada, M. Itoh, e K. Yanai, “Imaging of central itch modulation in the human brain using positron emission tomography”, *PAINÂ®*, vol. 105, n° 1, p. 339–346, set. 2003.
- [46] M. Ingvar, “Pain and functional imaging.”, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 354, n° 1387, p. 1347–1358, jul. 1999.
- [47] P. T. Bradford, S. S. Devesa, W. F. Anderson, e J. R. Toro, “Cutaneous lymphoma incidence patterns in the United States: a population-based study of 3884 cases”, *Blood*, vol. 113, n° 21, p. 5064–5073, maio 2009.
- [48] E. Olsen, E. Vonderheid, N. Pimpinelli, R. Willemze, Y. Kim, R. Knobler, H. Zackheim, M. Duvic, T. Estrach, S. Lamberg, G. Wood, R. Dummer, A. Ranki, G. Burg, P. Heald, M. Pittelkow, M.-G. Bernengo, W. Sterry, L. Laroche, F. Trautinger, S. Whittaker, e ISCL/EORTC, “Revisions to the staging and classification of mycosis fungoides and Sezary syndrome: a proposal of the International Society for Cutaneous Lymphomas (ISCL) and the cutaneous lymphoma task force of the European Organization of Research and Treatment of Cancer (EORTC)”, *Blood*, vol. 110, n° 6, p. 1713–1722, set. 2007.
- [49] L. Misery, “Pruritus in Cutaneous T-Cell Lymphomas”, in *Itch: Mechanisms and Treatment*, E. Carstens e T. Akiyama, Orgs. Boca Raton (FL): CRC Press, 2014.
- [50] B. D. Smith e L. D. Wilson, “Cutaneous Lymphoma”, *Curr. Probl. Cancer*, vol. 32, n° 2, p. 43–87, mar. 2008.
- [51] K. Ahern, E. S. Gilmore, e B. Poligone, “Pruritus in Cutaneous T-cell Lymphoma: A Review”, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 67, n° 4, p. 760–768, out. 2012.
- [52] G. I. AL Hothali, “Review of the treatment of mycosis fungoides and Sézary syndrome: A stage-based approach”, *Int. J. Health Sci.*, vol. 7, n° 2, p. 220–239, jun. 2013.
- [53] D. Seccareccia e N. Gebara, “Pruritus in palliative care”, *Can. Fam. Physician*, vol. 57, n° 9, p. 1010–1013, set. 2011.
- [54] M.-F. Demierre e J. Taverna, “Mirtazapine and gabapentin for reducing pruritus in cutaneous T-cell lymphoma”, *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 55, n° 3, p. 543–544, set. 2006.
- [55] A. Vij e M. Duvic, “Prevalence and severity of pruritus in cutaneous T cell lymphoma”, *Int. J. Dermatol.*, vol. 51, n° 8, p. 930–934, 2012.

QUESTÕES ÉTICAS

Informação dos participantes e consentimento informado

A Doutora Margarida Lima informará os doentes com LCCT que frequentam a CMLC sobre o estudo, entregando-lhes um folheto informativo (em anexo). Caso estes decidam participar, solicitará a assinatura do termo de consentimento informado (em anexo) e pedirá que avaliem a intensidade do prurido usando uma escala analógica numérica. De seguida, preencherá o formulário com informação sócio-demográfica, clínica e laboratorial (em anexo) e solicitará à enfermeira de serviço a colheita da amostra de sangue para as análises de investigação. Esta será feita em simultâneo com a colheita das amostras de sangue para as análises protocoladas para o estudo destes doentes. O contato com os doentes decorrerá em dias em que estes tenham consulta não havendo, por isso, deslocações especificamente para o estudo de investigação.

Relativamente aos controlos, que serão dadores benévolos de sangue do SHC do CHP/HSA, estes serão informados sobre o estudo pelo Dr. Marco Sampaio, colaborador, que também entregará o folheto informativo (em anexo) e solicitará a assinatura do termo de consentimento informado (em anexo). Novamente, uma vez que os dadores de sangue serão convidados a participar no estudo no dia em que vierem doar sangue, não haverá deslocações específicas para o estudo. As colheitas de sangue serão feitas pelas enfermeiras dos Dadores de Sangue do SHC do CHP.

Outras questões com implicações éticas

Riscos e benefícios

Não há riscos associados à participação no estudo, para além dos riscos mínimos associados à punção venosa para colheita da amostra de sangue periférico, já realizada nestes doentes por rotina.

Também não existem benefícios diretos para os participantes. No entanto, o estudo poderá contribuir para aprofundar os conhecimentos sobre a fisiopatologia do prurido associado aos LCCT e, a médio prazo, para descobrir novos alvos terapêuticos, pelo que, no futuro, se esperam benefícios para os doentes com LCCT em geral.

Confidencialidade e anonimização

A confidencialidade dos dados será garantida. As amostras de SP e os formulários com informação sócio-demográfica, clínica e laboratorial dos doentes serão numerados, fazendo corresponder a cada participante um código de identificação.

No registo dos dados em ficheiro eletrónico e no envio das amostras para o ICBAS/UP, serão usados apenas esses códigos; a correspondência entre os códigos e a identificação dos doentes será do conhecimento e responsabilidade da orientadora, Prof. Doutora Margarida Lima.

Outros aspetos

As amostras de sangue serão enviadas para o LC do SHC do CHP/HSA, em envelope fechado, juntamente com as requisições específicas do estudo de investigação, os termos de consentimento informado e os formulários com a informação clínica e laboratorial.

Os documentos ficarão arquivados em pasta própria, nas instalações do laboratório.

No LC serão separados os soros, que serão criopreservados até ao seu envio para o LI do ICBAS/UP, para quantificação de interleucinas.

No final do estudo as amostras excedentárias serão destruídas. Não serão realizados estudos genéticos.

Serão consultados dados dos processos clínicos dos doentes com LCCT admitidos no estudo cumprindo as normas estabelecidas pelo CHP; a consulta decorrerá nas instalações da consulta.

PLANO FINANCEIRO

Orçamento

	Custo estimado (€)
Reagentes (ver tabela seguinte)	2000,00
Material administrativo (fotocópias, folhas, etc.)	50.00
Contratação de serviços	00.00
Pagamento de despesas aos participantes (deslocações)	00.00
Exames realizados no CHP (análises e outros meios complementares)	00.00
Taxas moderadoras de episódios (consultas, internamentos, etc.)	00.00
Taxas moderadoras de exames (análises, exames de imagem, etc.)	00.00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50.00
Inscrição aluno em congresso médico	200.00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50.00
Custo de publicação de Artigo	1000.00
TOTAL	3.350.00

Reagentes

Finalidade	Designação	Fabricante	Referência	Fornecedor	Preço unitário s/ IVA (€)	Preço unitário c/ IVA (23%) (€)	Nº unidades	Preço c/ IVA (23%) (€)
Doseamento de IL-31 no soro	LEGEND MAX Human IL-31 ELISA Kit with Pre-coated Plates	Biolegend	437307	Grupo TAPER	396.67	487.90	1	487.90
Doseamento de IL-8 no soro	Legend Max Human IL-8 ELISA Kit with Pre-coated Plates	Biolegend	431507	Grupo TAPER	354.67	436.24	1	436.24
Total								924.14

São necessárias 2 embalagens de cada KIT, no total de aproximadamente 2000.00 euros

Financiamento

Parte dos reagentes para doseamento de IL-8 e de IL-31 (1 embalagem de cada kit) já estão disponíveis no LC do SHC do CHP e foram comprados com verbas disponibilizadas pela

UMIB/ICBAS/UP. É necessário financiamento de 2350,00 euros (para comprar uma embalagem adicional de cada um dos reagentes e para as restantes despesas).

GLOSSÁRIO

Abreviaturas de termos técnicos

- 5-HT₂, Receptor 2 da 5-hidroxitriptamina
- 5-HT₂, 5-hidroxitriptamina (serotonina)
- CGRP, *Calcitonin Gene Related Peptide*
- CMH, *C fibers Mechanical and Heat sensitive*
- CMiHi, *C fibers Mechanical insensitive and Heat insensitive*
- GRP, *Gastrin Releasing Peptide*
- H₁R, Receptor da Histamina tipo 1
- H₂R, Receptor da Histamina tipo 2
- H₃R, Receptor da Histamina tipo 3
- H₄R, Receptor da Histamina tipo 4
- HSA, Hospital de Santo António
- IL-31, Interleucina 31
- IL-8, Interleucina 8
- MF, Micose Fungóide
- NK-1, Neuroquinina 1
- NK-1R, Receptor da Neuroquinina 1
- PAR, *Proteases Activated Receptors*
- PGE₂, Prostaglandina E₂
- PLCβ₃, *Phospholipase C beta 3* (fosfolipase C β₃)
- SP, Substância P
- SS, Síndrome de Sezary
- TRPV1, *Transient Receptor Potential cation channel, subfamily Vanilloid, member 1*.

Outras abreviaturas

- BLHD, *Blood, Lymphopoietic and Hematopoietic Disorders*, UMIB/ICBAS/UP
- CEHIP, *Clinical and Experimental Hematology and Immunopathology*, UMIB/ICBAS/UP
- CESPUP, Cooperativa de Ensino Superior Universitário
- CHP, Centro Hospitalar do Porto
- CMLC, Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos e Mastocitoses
- DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica
- DM, Departamento de Medicina
- FFUP, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- HSA, Hospital de Santo António
- ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
- IINFACIS, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde
- IPSN, Instituto Politécnico da Saúde Norte
- JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica

- LB, Laboratório de Bioquímica
 - LC, Laboratório de Citometria
 - SHC, Serviço de Hematologia Clínica
 - UMIB/ICBAS/UP, Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica do ICBAS/UP
- UP, Universidade do Porto

ANEXOS

LISTA DE ANEXOS

- Documentos para os participantes
 - Termos de consentimento informado (doentes e dadores de sangue)
 - Folhetos informativos (doentes e dadores de sangue)
- Documentos de submissão
 - Lista de documentos
 - Folha de rosto
 - Pedidos de autorização
 - Termos de responsabilidade
 - Termos de autorização local

DOCUMENTOS PARA OS PARTICIPANTES

Termo de consentimento informado para doentes participantes

Fisiopatologia do prurido nos linfomas cutâneos de células T

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Eu, abaixo assinado (nome completo) _____
_____, fui informado (a) de que o estudo referido pretende estudar alterações de algumas moléculas no sangue de doentes com linfomas cutâneos de células T, com o objetivo de compreender melhor as causas do prurido (comichão) nestes doentes.

Fui informado(a) de que serão recolhidos alguns dados do meu processo clínico e que será colhida uma amostra do meu sangue para realização de análises no Hospital de Santo António e na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Foi-me garantida a confidencialidade dos dados de identificação de todos os participantes.

Reconheço também que posso, a qualquer momento, recusar-me a participar, ou interromper a minha participação neste estudo, sem que daí decorra qualquer penalização.

Compreendi a informação facultada, e foi-me dada a oportunidade de colocar dúvidas, e de as ver esclarecidas.

Assim, aceito participar de livre vontade no estudo em questão, e permito a colheita de sangue para as análises que estão previstas. Autorizo também a divulgação dos resultados do estudo, mantendo-se a confidencialidade dos meus dados identificativos.

Nome do doente participante:

Data:

Assinatura:

Nome do investigador:

Data:

Assinatura:

Folheto informativo para doentes participantes

Fisiopatologia do prurido nos linfomas cutâneos de células T

Exmo. Sr. Utente do Centro Hospitalar do Porto,

Enquanto aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e sob a supervisão da Professora Doutora Margarida Lima e da Professora Doutora Maria Alice Santos, estou a realizar um estudo sobre a comichão (prurido) que aparece nos doentes com linfomas cutâneos de células T.

Os linfomas cutâneos de células T são um conjunto de doenças da pele que se caracterizam por uma produção anormal e excessiva de células T, que são um dos vários tipos de glóbulos brancos que possuímos. Os glóbulos brancos são células de que precisamos para nos protegermos de doenças, mas nestas situações, causam eles-mesmos doença.

Não se sabe muito bem porquê, mas um dos sintomas dos linfomas desta natureza é a comichão, que é desagradável e aflitiva para os doentes. No entanto, não há muitos medicamentos eficazes para esta comichão, sabe-se muito pouco sobre ela, e parece ser um pouco diferente das comichões, por exemplo, da alergia.

Este estudo, para o qual solicitávamos a sua participação, foi montado para tentar perceber se algumas moléculas que conhecemos poderão estar envolvidas na comichão causada por esta doença.

Para isto, pedíamos que autorizasse uma colheita de sangue, realizada em conjunto com a colheita de rotina, que dissesse de acordo com a escala fornecida a comichão que sente e que autorizasse alguns registos do seu processo clínico.

A sua identidade será mantida confidencial.

A participação neste estudo não trará qualquer tipo de risco para si, e permitirá que se compreendam melhor os sintomas desta doença.

Qualquer dúvida poderá ser colocada à Dra. Margarida Lima na consulta ou a mim, através do seguinte telefone: 937198374

Obrigada pela participação,

Maria Abreu

Termo de consentimento informado para dadores de sangue

Fisiopatologia do prurido nos linfomas cutâneos de células T

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Eu, _____ abaixo assinado _____ (nome completo) _____, fui informado (a) de que o estudo referido pretende estudar alterações de algumas moléculas no sangue de doentes com linfomas cutâneos de células T, com o objetivo de compreender melhor as causas do prurido (comichão) nestes doentes.

Para esse estudo são necessárias amostras de sangue de pessoas normais, sem prurido, e por isso foi pedida a minha colaboração.

Fui informado(a) de que será colhida uma amostra do meu sangue para realização de análises no Hospital de Santo António e na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Foi-me garantida a confidencialidade dos dados de identificação de todos os participantes.

Reconheço também que posso, a qualquer momento, recusar-me a participar, ou interromper a minha participação neste estudo, sem que daí decorra qualquer penalização.

Compreendi a informação facultada, e foi-me dada a oportunidade de colocar dúvidas, e de as ver esclarecidas.

Assim, aceito participar de livre vontade no estudo em questão, e permito a colheita de sangue para as análises que estão previstas.

Autorizo também a divulgação dos resultados do estudo, mantendo-se a confidencialidade dos meus dados identificativos.

Nome do dador participante:

Data:

Assinatura:

Nome do investigador:

Data:

Assinatura:

Folheto informativo para dadores de sangue

Fisiopatologia do prurido nos linfomas cutâneos de células T

Exmo. Dador de Sangue do Centro Hospitalar do Porto,

Enquanto aluna do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar e sob a supervisão da Professora Doutora Margarida Lima e da Professora Doutora Maria Alice Santos, estou a realizar um estudo sobre a comichão (prurido) que aparece nos doentes com linfomas cutâneos de células T.

Os linfomas cutâneos de células T são um conjunto de doenças da pele que se caracterizam por uma produção anormal e excessiva de células T, que são um dos vários tipos de glóbulos brancos que possuímos. Os glóbulos brancos são células de que precisamos para nos protegermos de doenças, mas nestas situações, causam eles-mesmos doença.

Não se sabe muito bem porquê, mas um dos sintomas dos linfomas desta natureza é a comichão, que é desagradável e aflitiva para os doentes. No entanto, não há muitos medicamentos eficazes para esta comichão, sabe-se muito pouco sobre ela, e parece ser um pouco diferente das comichões, por exemplo, da alergia.

Este estudo, para o qual solicitávamos a sua participação, foi montado para tentar perceber se algumas moléculas que conhecemos poderão estar envolvidas na comichão causada por esta doença.

Para realizar o estudo necessitamos de algumas amostras de sangue de pessoas normais, sem comichão. Para isto, pedíamos que autorizasse uma colheita de sangue, realizada em conjunto com a dádiva de sangue.

A sua identidade será mantida confidencial.

A participação neste estudo não trará qualquer tipo de risco para si, e permitirá que se compreendam melhor os sintomas desta doença.

Qualquer dúvida poderá ser colocada à Dra. Margarida Lima na consulta ou a mim, através do seguinte contato: 937198374

Obrigada pela participação,

Maria Abreu

Lista de documentos para

TRABALHOS ACADÉMICOS DE INVESTIGAÇÃO (que conferem grau)

	Data de entrega (ou NA, não aplicável)	Secretariado (Assinatura)
Documentos comprovativos		
Inscrição em Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	NA	
Cartas do Aluno, a solicitar autorização institucional		
Presidente do Conselho de Administração	<input checked="" type="checkbox"/>	
Presidente da CES	<input checked="" type="checkbox"/>	
Diretor do DEFI	<input checked="" type="checkbox"/>	
Termos de responsabilidade de Alunos e Orientadores		
Aluno	<input checked="" type="checkbox"/>	
Orientador do Projeto	<input checked="" type="checkbox"/>	
Supervisor do Projeto, Docente responsável pela DIIC	<input checked="" type="checkbox"/>	
Termos de autorização local (no CHP)		
Responsáveis por Unidades / Gabinetes / Setores*	<input checked="" type="checkbox"/>	
Diretores de Serviço	<input checked="" type="checkbox"/>	
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamentos	<input checked="" type="checkbox"/>	
Proposta		
Folha de Rosto do Estudo de Investigação (modelo próprio)	<input checked="" type="checkbox"/>	
Proposta de Trabalho Académico de Investigação	<input checked="" type="checkbox"/>	
Anexos		
Curriculum Vitae do Aluno	NA	
Termo de Consentimento Informado	<input checked="" type="checkbox"/>	
Folheto com informação para dar aos Participantes	<input checked="" type="checkbox"/>	
Carta a solicitar dispensa de Consentimento Informado*	NA	
Inquéritos / questionários ou guiões de entrevistas*	NA	
Formulário para recolha de dados dos processos clínicos*	<input checked="" type="checkbox"/>	
Outros documentos*	NA	

NA, não aplicável.

SECRETARIADO: Data de conclusão da entrega de documentação

Data

Assinatura

____/____/____

DOCUMENTOS DE SUBMISSÃO

Folha de rosto do estudo de investigação

TÍTULO

FISIOPATOLOGIA DO PRURIDO NOS LINFOMAS CUTÂNEOS DE CÉLULAS T – PAPEL DAS INTERLEUCINAS 8 E 31

CLASSIFICAÇÃO

Trabalho Académico de Investigação ☒ (Mestrado Integrado em Medicina)

Projeto de Investigação ☒ Ensaio Clínico ☐ Outro ☐ Qual?

VERSÃO

Novo ☒ Modificação / Adenda ☐ Prolongamento ☐

CALENDARIZAÇÃO

Data início: junho 2015

Data conclusão: (execução)

Prazo a cumprir: junho 2015

ALUNOS E ORIENTADORES

Aluno

Maria de Abreu Nunes da Silva; Mestrado Integrado em Medicina, ICBAS/UP e CHP.
Telemóvel: 937198374; E-mail: Maria_dabreu@hotmail.com

Orientadores do projeto

Orientadora: Margarida Lima, médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, SHC do HSA/CHP; professora auxiliar convidada do ICBAS/UP; regente da DIIC; investigadora da Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica (UMIB/ICBAS/UP (grupo de investigação: CEHIP – *Clinical and Experimental Hematology and Immunology*)).

TM: 966327115; E-mail: margaridalima@chporto.min-saude.pt ; mmc.lima@clix.pt

Coorientadora: Alice Santos Silva, licenciada em Ciências Farmacêuticas; doutorada em Ciências Farmacêuticas; professora associada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), Laboratório de Bioquímica; investigadora da UCIBIO, REQUIMTE (grupo de investigação: *Drugs Targets & Biomarkers*) TF: 220428563; E-mail: assilva@ff.up.pt

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Margarida Lima; médica, especialista em imunohemoterapia, assistente hospitalar graduada, SHC do HSA/CHP; professora auxiliar convidada do ICBAS/UP; regente da DIIC

TM: 966327115; E-mail: margaridalima@chporto.min-saude.pt ; mmc.lima@clix.pt

OUTROS INVESTIGADORES E COLABORADORES

Investigadores

Susana Coimbra, licenciada em Ciências Farmacêuticas; doutorada em Ciências Farmacêuticas; professora adjunta do Instituto Politécnico da Saúde Norte (IPSN), Cooperativa de Ensino Superior Universitário (CESPU); investigadora da UCIBIO, REQUIMTE (grupo de investigação: *Drugs Targets & Biomarkers*) e Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (IINFACTS). E-mail: ssn.coimbra@gmail.com carla.coimbra@ipsn.cespu.pt TM: 962677495

Mafalda Castro, médica interna de Hematologia Clínica do SHC do HSA/CHP.

Colaboradores

Enfermeiras do Hospital de Dia do HSA/CHP (sala de colheitas da Consulta de Hematologia) e do Setor de Dadores de Sangue do SHC do HSA/CHP. Profissionais do LC do SHC do HSA/CHP.

Marco Sampaio, médico interno de Imunohemoterapia do SHC do HSA/CHP.

PROMOTOR ☒ O próprio

INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

Consulta Multidisciplinar de Linfomas Cutâneos do HSA/CHP;

Laboratório de Citometria e Setor de Dadores de Sangue do Serviço de Hematologia Clínica do HSA/CHP (Departamento de Medicina do HSA/CHP)

Outras Instituições intervenientes

Laboratório de Bioquímica da FFUP

CARATERÍSTICAS do estudo

Alvo do estudo

Animais ☐ Humanos ☒

Países / Instituições envolvidos

Multinacional ☐ Nacional ☒
Multicêntrico ☐ Institucional ☒

Natureza do estudo

Clínico ☒ Terapêutico ☐
Epidemiológico ☐ Laboratorial ☒

Caraterísticas do estudo (desenho)

Descritivo ☐ Analítico ☒
Observacional ☒ Experimental ☐
Transversal ☒ Longitudinal ☐

Participantes

Existência de grupo controlo: Não ☐ Sim ☒

Seleção dos Participantes: Aleatória ☐ Não aleatória ☒ (por conveniência)

Estudos observacionais:

Tipo: Caso ☐ Série de casos ☐ Casos-controlos ☒ Coorte ☐ Outro ☐

Estudos experimentais: (não aplicável)

Conhecimento: Aberto ☐ Cego ☐ (Duplamente cego ☐)

Ensaio Clínico: Fase I ☐ Fase II ☐ Fase III ☐ Fase IV ☐

Outros aspetos relevantes para a apreciação do estudo:

Participação de grupos vulneráveis Não ☒ Sim ☐
Convocação de doentes / participantes Não ☒ Sim ☐
Consentimento informado Não ☐ Sim ☒
Inquéritos / questionários Não ☒ Sim ☐
Entrevistas Não ☒ Sim ☐
Colheita de produtos biológicos Não ☐ Sim ☒ (No CHP ☒ Noutro local ☐) (Não anonimizados ☒)
Armazenamento de produtos biológicos Não ☐ Sim ☒ (No CHP ☒ Apenas até à realização das análises)
Criação de bancos de produtos biológicos Não ☒ Sim ☐
Realização de exames / análises Não ☐ Sim ☒ (No CHP ☒ e na FFUP ☒)
Realização de estudos genéticos Não ☒ Sim ☐
Recolha de dados Não ☐ Sim ☒ (Dados: clínicos ☒ laboratoriais: analíticos ☒ / imagem ☐)
Criação de bases de dados Não ☐ Sim ☒ (Ficheiro Excel anonimizado)
Saída para outras instituições Não ☒ Sim ☒ (Produtos biológicos ☒ (Públicas ☒ Nacionais ☒) (FFUP) (Anonimização dos produtos biológicos saídos ☒)

ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Orçamento total: **3.350,00 euros**

Contrato financeiro em anexo: Não ☒

Financiamento:

Interno (CHP) 0.00 euros Externo (Outros): 3.350,00 euros

Entidades financiadoras:

ICBAS/UP – Bolsa DIIC (2.350,00 euros) e UMIB/ICBAS/UP (1.000,00 euros)

INDICADORES

Relatórios de progresso ☐ (periodicidade:) Relatório final ☐

Outros ☒ Quais? Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Data:

Assinatura do proponente (Aluno):

Pedidos de autorização institucional

Trabalho académico de investigação:

Fisiopatologia do prurido nos Linfomas Cutâneos de Células T: Papel das interleucinas 8 e 31

Aluno da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: Maria de Abreu Nunes da Silva

Presidente do Conselho de Administração do CHP

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

Maria de Abreu Nunes da Silva, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

___/___/___

Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Maria de Abreu Nunes da Silva, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

___/___/___

Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Exma. Senhora Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Maria de Abreu Nunes da Silva, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

___/___/___

Termos de responsabilidade

Trabalho académico de investigação:

Fisiopatologia do prurido nos Linfomas Cutâneos de Células T: Papel das interleucinas 8 e 31

Aluno da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: Maria de Abreu Nunes da Silva

Aluno

Na qualidade de Aluna, comprometo-me a executar o estudo de investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Aluno	Data	Assinatura
_____	____/____/____	_____

Orientador do projeto

Na qualidade de Orientadora, solicito autorização do Conselho de Administração para que a Aluna acima referido possa desenvolver no CHP o seu estudo de investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar o Aluna nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Prof. Doutora Margarida Lima	____/____/____	_____

Instituição	Departamento	Serviço / Setor
HSA/CHP	Medicina	Serviço de Hematologia Clínica

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Na qualidade de Docente Responsável pela DIIC / Supervisor da Aluna no CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do estudo de investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei a Aluna, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Prof. Doutora Margarida Lima	____/____/____	_____

Docente responsável pela DIIC

Termos de autorização local

Trabalho académico de investigação:

Fisiopatologia do prurido nos Linfomas Cutâneos de Células T: Papel das interleucinas 8 e 31

Aluno da DIIC do curso de MIM do ICBAS/UP e do CHP: Maria de Abreu Nunes da Silva

Responsáveis por Unidades, Gabinetes ou Setores

Na qualidade de médica responsável pelo Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do CHP, dou parecer favorável à execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Nome do Responsável	Data	Assinatura
Prof. Doutora Margarida Lima	___/___/___	_____

Diretores de Serviço

Na qualidade de Diretor do Serviço de Hematologia Clínica, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Hematologia Clínica	Dr. Jorge Coutinho	___/___/___	_____

Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento

Na qualidade de Diretor do Departamento de Medicina, declaro que autorizo a execução do estudo de investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Departamento	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Medicina	Prof. Doutor Rui Sarmiento	___/___/___	_____